

Aus der Klinik für Kleintiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und
der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

**Interaktion einer Blockade des Rezeptors für den Epidermalen Wachstumsfaktor
(EGFR) mit der Gabe von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) bei der Strahlenreak-
tion der Mundschleimhaut – tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Astrid Fehrmann
aus Dresden

Leipzig, 2010

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Prof. Dr. Gerhard Oechtering
Prof. Dr. Wolfgang Dörr

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Oechtering, Klinik für Kleintiere, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. Wolfgang Dörr, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Technische Universität Dresden
Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Rostock

Tag der Verteidigung: 26.01.2010

Meinen Eltern und meinem Freund

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturüberblick.....	4
2.1	Bedeutung von Tumorerkrankungen	4
2.2	Bedeutung von Kopf-Hals-Tumoren	4
2.3	Therapieoptionen bei Kopf-Hals-Tumoren	5
2.3.1	Chirurgische Therapie	6
2.3.2	Chemotherapie	6
2.3.3	Strahlentherapie	6
2.3.3.1	Radiotherapie-Protokolle	7
2.3.4	Strahlentherapie in der Veterinärmedizin	10
2.4	Allgemeine Pathogenese der Strahlenreaktion von Normalgeweben.....	15
2.5	Radiogene Mucositis enoralis – Strahlenreaktion der Mundschleimhaut.....	15
2.5.1	Pathogenese und zeitlicher Verlauf	15
2.5.2	Klinische Bedeutung der Mucositis enoralis	16
2.5.3	Dokumentation	17
2.6	Aufbau und proliferative Organisation der Mundschleimhaut	19
2.6.1	Allgemeine Anatomie der Mundhöhle und der Zunge	19
2.6.2	Anatomie der Zunge	19
2.6.3	Histologie des Epithels der Zungenunterseite der Maus	19
2.6.3.1	Proliferative Organisation der Zungenunterseite	20
2.6.4	Besonderheiten der humanen Mundschleimhaut	22
2.7	Prophylaxe und Behandlung der Mucositis enoralis.....	22
2.8	Einflussfaktoren der Strahlenempfindlichkeit	26
2.8.1	Intrinsische Strahlenempfindlichkeit	26
2.8.2	Erholungskapazität (Recovery)	27
2.8.3	Repopulierung	28
2.8.4	Reoxygenierung	29
2.8.5	Redistribution.....	29
2.9	Tiermodelle zur Untersuchung der radiogenen Mucositis enoralis	29
2.10	Epidermaler Wachstumsfaktor – EGF	31
2.10.1	Struktur und physiologische Funktion	31
2.10.2	EGF-Rezeptor	31
2.10.3	Möglichkeiten und Potential der EGFR-Inhibition	32
2.11	Keratinozyten-Wachstumsfaktor – KGF	33
2.11.1	Struktur und physiologische Funktion	33
2.11.2	KGF-Rezeptor	33
2.11.3	In-vitro Versuche zur Wirkung von rHuKGF	34
2.11.4	Wirkung von KGF auf normale, unbehandelte Gewebe	34
2.11.5	Bedeutung bei der Wundheilung.....	34
2.11.6	Wirkung von rHuKGF an der bestrahlten Mundschleimhaut	35
2.11.7	Klinische Studien	35

3	Material und Methoden	37
3.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	37
3.2	Versuchsdurchführung	37
3.2.1	Bestrahlungsmethoden	37
3.2.1.1	Perkutane Bestrahlung	37
3.2.1.2	Lokale Bestrahlung der Zungenunterseite	40
3.2.1.3	Klinische Beurteilung der Strahlenreaktion	41
3.2.2	EGFR-Inhibitor	42
3.2.3	Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF)	42
3.3	Beschreibung der Experimente	42
3.3.1	Kontrollversuche	42
3.3.1.1	Lokale Einzeitbestrahlung (Versuche M1.x)	42
3.3.1.2	Applikation des EGFR-Inhibitors ohne/mit KGF (Versuche E0.x)	43
3.3.2	Fraktionierungsprotokolle	43
3.3.2.1	Bestrahlung mit 5x3 Gy, gefolgt von lokaler Testbestrahlung (Versuche F1.x)	43
3.3.2.2	Bestrahlung mit 10x3 Gy, gefolgt von lokaler Testbestrahlung (Versuche F2.x)	43
3.3.3	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	44
3.3.3.1	Bestrahlungsprotokolle	44
3.3.3.2	Zungenentnahme und Fixierung	44
3.3.3.3	HE-Färbung	45
3.3.3.4	TEC-3: Immunhistochemische Färbung	45
3.3.3.5	Cytokeratin 6: Immunhistochemische Färbung	46
3.3.3.6	Auswertung der Schnitte	47
3.4	Statistische Auswertung der Daten	47
3.4.1	Dosis-Effekt-Analysen	47
3.4.2	Zeitlicher Verlauf	48
3.4.3	Histologische Untersuchungen	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Lokale Einzeitbestrahlung (Versuche M1/x)	49
4.1.1	Reaktion der Mundschleimhaut auf Einzeitbestrahlung	49
4.1.2	Dosisabhängigkeit	50
4.1.3	Zeitlicher Verlauf	51
4.2	Applikation des EGFR-Inhibitors ohne/mit KGF (Versuch E0)	53
4.3	Fraktionierte Bestrahlung	53
4.3.1	Alleinige Bestrahlung über 1 bzw. 2 Wochen (Versuch F1/1 bzw. F2/1)	53
4.3.2	Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche und Applikation von BIBX1382BF ohne/mit KGF	54
4.3.3	Bestrahlung mit 10x3 Gy und Applikation von BIBX1382BF ohne/mit KGF	56
4.4	Histomorphologie des bestrahlten Epithels	58
4.4.1	Einzeitbestrahlung	58
4.4.2	Fraktionierte Bestrahlung	59
4.5	Quantitative Auswertung	60
4.5.1	Unbehandelte Schleimhaut	60
4.5.2	Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche über 1 oder 2 Wochen	60

4.5.2.1	Zellzahlen	61
4.5.2.2	Epitheldicken	66
4.5.2.3	Zellvolumen	72
4.6	Proliferationsuntersuchungen	74
4.6.1	Bestrahlung mit 5x3 Gy über 1 Woche.....	75
4.6.2	Bestrahlung mit 10x3 Gy über 2 Wochen.....	77
5	Diskussion.....	79
5.1	Klinischer Hintergrund	79
5.2	Funktionelle Untersuchungen	81
5.3	Strahlenreaktion nach fraktionierter Bestrahlung - Ulkuszinzidenz und zeitlicher Verlauf82	
5.4	Einfluss der EGFR-Blockade durch BIBX1382BF auf die Ausprägung der radiogenen Mukositis	83
5.4.1	Wirkung von BIBX1382BF auf Ulkuszinzidenz und zeitlichen Verlauf.....	83
5.5	Einfluss von Keratinozyten-Wachstumsfaktor	84
5.5.1	Fraktionierte Bestrahlung und Wirkung von BIBX1382BF und /oder KGF	84
5.5.2	Statistische Aussagekraft der Untersuchungen.....	86
5.5.3	Wirkung von KGF bei der gemeinsamen Gabe mit BIBX1382BF	87
5.6	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	87
5.6.1	Veränderungen im Epithel nach Einzeitbestrahlung.....	88
5.6.2	Fraktionierte Bestrahlung.....	89
5.6.3	Einfluss von BIBX1382BF	90
5.6.4	Einfluss von KGF zusammen mit BIBX1382BF.....	91
5.7	Theorien zum Wirkmechanismus von KGF.....	92
5.7.1	Tumorstirksamkeit von rHuKGF	93
5.8	Ausblick.....	93
6	Zusammenfassung	95
7	Summary.....	97
8	Literaturverzeichnis	99
9	Anhang.....	116

Abkürzungsverzeichnis

α/β -Wert	Verhältnis der Parameter α (zytotoxaler Schaden) und β (subletaler Schaden) im linearquadratischen Modell; Einheit Gy
BIBX1382BF	N8-(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-N2-(1-methyl-piperidin-4-yl)-pyrimido[5,4-d]pyrimidine –2,8-diamine dihydrochloride
CTC	Common Toxicity/Terminology Criteria
DEGRO	Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie
DGZ	Deutsche Gesellschaft für Zahnerhaltung
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
D ₀	Strahlenempfindlichkeit von Zellen: diejenige Strahlendosis, die dass Zellüberleben auf e ⁻¹ (d.h. 37 %) ihres vorherigen Wertes im exponentiellen Anteil der Zellüberlebenskurve reduziert
ED ₅₀	Strahlendosis, die bei 50 % der Individuen einen Effekt (Ulzeration) auslöst
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-Rezeptor)
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ERB	Tyrosinkinaserzeptoren, zu denen der EGFR gehört
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FGF(R)	Fibroblast Growth Factor (Receptor) (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER/c-erbB	Onkogene, die für einen Wachstumsfaktor-Rezeptor aus der Familie der Tyrosinasen kodieren
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül)
KGF	Keratinocyte Growth Factor (Keratinocyten-Wachstumsfaktor)
KGFR	Keratinocyte Growth Factor Receptor (KGF-Rezeptor)
mAb	monoclonal Antibody (monoklonaler Antikörper)
LQ-Modell	linear-quadratisches Modell der Strahlenwirkung
NCI	National Cancer Institute (USA)
OMAS	Oral Mucositis Assessment Scale
PK	Proteinkinase
rHuKGF	rekombinant human Keratinocyte Growth Factor (Palifermin)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTOG	Radiation Therapy and Oncology Group
SAS	Statistical Analysis System
SD	Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
SF	surviving fraction
SPF	spezifiziert pathogenfrei
S-Phase	Synthesephase im Zellzyklus, in der die DNA repopuliert wird
σ	Standardabweichung der ED ₅₀ (Probit-Analyse)
TGF- α	Transforming Growth Factor- α
TK	Tyrosinkinase
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
UICC	Union International Contre le Cancer

1 Einleitung

Tumorerkrankungen stehen in den Industrienationen hinter Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle der Statistik der Todesursachen beim Menschen. Auch beim Kleintier stellen die Krebserkrankungen eine häufige Todesursache dar. Etwa 50% aller Hunde, die älter als zehn Jahre sind, sterben direkt oder indirekt an den Folgen eines Malignoms. Aufgrund der zunehmend engeren Mensch-Tier-Beziehung gewinnt der Wunsch der Tierbesitzer nach einer Therapie ihres krebserkrankten Tieres zunehmend an Bedeutung (DORSCH 2002, KESSLER 2005).

Strahlentherapie, Chirurgie und Chemotherapie stellen in der Humanmedizin die wichtigsten Behandlungsmodalitäten bei Tumorerkrankungen dar (HOWALDT u. KAINZ 1997). Jeder zweite Krebspatient muss sich heute im Verlauf seiner Erkrankung einer Bestrahlung unterziehen. Dieser Anteil wird aufgrund der Zunahme von funktionell erhaltenden Therapieformen in den nächsten Jahrzehnten weiter ansteigen (DÖRR et al. 2005). In der Tiermedizin findet die Strahlentherapie überwiegend in den USA eine breite, routinemäßige Anwendung (KASER-HOTZ et al. 2005). Mittlerweile sind aber auch im deutschsprachigen Raum einige Zentren gegründet worden, die eine Strahlentherapie für Tiere anbieten (KANDEL 2004).

Bereits kurze Zeit nach Entdeckung der Röntgenstrahlen berichtet Richard Eberlein über seine Ergebnisse der Bestrahlung von Haustieren (EBERLEIN 1906). Der Leiter des Röntgen-Institutes der Wiener Veterinärmedizinischen Hochschule, Alois Pommer, bestrahlt 1938 die ersten Tiere mit chronischen Erkrankungen, im weiteren Verlauf auch mit Sarkomen und Karzinomen. Seine Erfahrungen beeinflussen wesentlich die Entwicklung der Strahlentherapie in der Human- und auch in der Veterinärmedizin (HIRSCHFELD et al. 2001). Die weitere Entwicklung der Strahlentherapie in der Tiermedizin findet im Wesentlichen in den USA statt und wird von den Tierärzten Owen, Carlson und Gillette geprägt (HIRSCHFELD et al. 2001). Kurative (heilende) oder palliative (lebensverlängernde) Tumorbestrahlungen finden in der Veterinärmedizin dort Einsatz, wo eine vollständige chirurgische Tumoresektion aus kosmetischen, funktionellen oder anatomischen Gründen nur eingeschränkt möglich ist, wie beispielsweise an den Gliedmaßen oder bei Tumoren der Maul- und Nasenhöhle, wie Plattenepithelkarzinomen, malignen Melanomen, Fibrosarkomen und Zahnfleischgeschwülsten (akanthomatöse Epuliden). Bei Tumoren des Zentralnervensystems gilt die Strahlentherapie als Mittel der Wahl.

Während in der Humanmedizin kurative Protokolle mit täglicher Bestrahlung (5 Tage/Woche) über sechs bis sieben Wochen durchgeführt werden, haben sich diese Behandlungsschemata in der Veterinärmedizin aufgrund der Notwendigkeit der Narkose für jede Bestrahlungssitzung bisher nicht durchgesetzt. Ein heute gängiges Protokoll in der Tiermedizin besteht in 10-12 Fraktionen von 4 Gy, dreimal pro Woche nach einem Montag Mittwoch Freitag-Schema.

Jede Strahlentherapie schließt die Exposition von gesundem Normalgewebe in das Hochdosisvolumen ein. Dies betrifft normale Strukturen, wie etwa Gefäße, innerhalb des Tumors, Gewebe in den Randbereichen, in denen eine mikroskopische Infiltration vermutet wird, aber auch Gewebe und Organe in den Ein- und Austrittskanälen der Strahlung. Trotz modernster Bestrahlungsverfahren ist deshalb der Anteil von gesundem Normalgewebe im bestrahlten Volumen meist deutlich größer als das eigentliche Tumolvolumen (DÖRR et al. 2005). Somit

muss bei der Planung der Strahlentherapie immer ein Kompromiss zwischen einer möglichst hohen (optimalen) Tumorwirkung und einer tolerablen Nebenwirkungsrate eingegangen werden.

Die radiogenen Nebenwirkungen werden in frühe Reaktionen, die innerhalb von 90 Tagen nach Beginn der Therapie eintreten, und späte Komplikationen unterteilt. Die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut, Mucositis enoralis, gehört zu den häufigsten, dosislimitierenden, frühen Nebenwirkungen bei der Radio(chemo)therapie im Kopf-Hals-Bereich (DÖRR et al. 2007, DÖRR et al. 2005). Diese Reaktion ist mit erheblichen Schmerzen und Schluckstörungen verbunden (DÖRR et al. 2005). Nicht selten erzwingt sie eine Unterbrechung der Behandlung, mit der Folge einer Reduktion der Tumorheilungschancen (DÖRR et al. 2007, FOWLER u. LINDSTRÖM 1992). Daneben hat die Frühreaktion Einfluss auf das Risiko für chronische Strahleneffekte in der Mundhöhle in Form von konsekutiven Spätfolgen, wie Fibrosen, chronische Ulzera oder Nekrosen (DÖRR u. HENDRY 2001, DÖRR et al. 2007). Die orale Mukositis stellt auch einen wesentlichen Kostenfaktor im Gesundheitswesen dar (ELTING et al. 2007).

Die Vermeidung oder Verminderung der Schleimhautreaktion ist deshalb ein probates Mittel zur Verbesserung des Erfolgs der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren. Eine wichtige Rolle spielen hier die Zahn- und Mundhygiene, die persönliche Betreuung sowie die Therapieplanung (Volumen). Parallel dazu wird eine Vielzahl experimenteller und klinischer Ansätze zu Prophylaxe und Behandlung der radiogenen Mucositis enoralis diskutiert, ohne dass bisher eine spezifische Strategie allgemeinen Eingang in die klinische Routine gefunden hat (DÖRR et al. 2007, DÖRR et al. 2008). Das Ziel der meisten Ansätze ist es, durch topische Applikation von Antiseptika eine sekundäre Infektion zu vermeiden. Durch lokale Vasokonstriktion mittels Kryotherapie mit der Erzeugung einer Strahlenresistenz fördernden lokalen Hypoxie wird versucht, einen Schutz der Schleimhaut zu erreichen. Der Einsatz von Wachstumsfaktoren, wie Interleukin-1, Transforming growth factor- β (TGF- β), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Insulin-like growth factor (IGF) I und II werden ebenso vorgeschlagen wie die Anwendung von Radikalfänger Amifostin, Selen oder Superoxid-Dismutase. Auch die Therapie mit adulten Stammzellen wird getestet (DÖRR et al. 2007, DÖRR et al. 2008). Ein weiterer, sehr viel versprechender Ansatz ist der Einsatz des Keratinozyten-Wachstumsfaktors (rekombinanter humaner KGF, Palifermin). KGF bewirkt in Epithelien eine Steigerung der Zellneubildung, eine Modulation von Differenzierungsvorgängen, aber auch andere, zelluläre Effekte, wie etwa eine Stimulation von DNA-Reparaturprozessen. Für die systemische Gabe von KGF im Rahmen der konditionierenden Behandlung vor Stammzelltransplantationen liegt eine Zulassung auf der Basis großer kontrollierter klinischer Studien vor (VON BÜLTZINGLÖWEN et al. 2006). Für die Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren liegen aktuell positive Ergebnisse derartiger Studien in Form eines Kongressbeitrags vor (HENKE et al. 2008).

In jüngster Zeit werden Ansätze zur selektiven, auf der Tumorbilogie beruhenden Beeinflussung der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren getestet. Hierzu zählt die Blockade des Rezeptors für den Epidermalen Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF), der in vielen Tumoren überexprimiert ist und in Verbindung mit der Therapieresistenz gebracht wird. Nach einer Strahlenexposition wird jedoch auch in der Mundschleimhaut eine erhöhte Expression von EGF und EGF-Rezeptor (EGFR) beschrieben (DÖRR et al. 2000). Damit besteht die Gefahr, dass eine Blockade des EGFR mit dem Ziel der Verbesserung der Tu-

morheilung auch zu einer Verschlimmerung der Nebenwirkungen führen kann. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb die Auswirkung einer Blockade des EGFR auf die Schleimhautreaktion unter fraktionierter Bestrahlung dargestellt werden. Weiterhin soll eine mögliche Interaktion dieser Blockade mit der schleimhautschützenden Wirkung von KGF untersucht werden.

Ein etabliertes Modell für strahlenbiologische Untersuchungen zur radiogenen oralen Mukositis ist die Zungenschleimhaut der Maus (DÖRR 1987, 1997). Die Beeinträchtigung der Tiere wird durch die Beschränkung der klinischen Reaktion auf ein kleines Areal der Zungenunterseite auf ein Minimum reduziert. Dadurch entfällt die Gefahr einer Beeinflussung der Schleimhautreaktion durch den Rückgang der Nahrungsaufnahme mit den entsprechenden Konsequenzen für den Ernährungszustand.

In den vorliegenden Untersuchungen wird in kliniknahen Protokollen eine fraktionierte Strahlentherapie appliziert. Die gezielte Blockade des EGFR erfolgt durch den Tyrosinkinase-Inhibitor BIBX1382BF. In funktionellen Untersuchungen wird die Häufigkeit einer Ulzeration der Schleimhaut als klinisch relevanter Endpunkt untersucht.

In begleitenden histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wird die Wirkung von BIBX1382BF und KGF auf die Morphologie und Proliferation der Mundschleimhaut unter Bestrahlung dargestellt.

Die spezifischen Fragen der vorliegenden Arbeit sind somit:

1. Hat eine EGFR-Inhibition eine Veränderung der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut (unter fraktionierter Bestrahlung) zur Folge?
2. Beeinflusst eine EGFR-Inhibition die mukoprotektive Wirkung von KGF?

Alle Untersuchungen werden mit dem etablierten Tiermodell der Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus durchgeführt; als klinisch relevanter Endpunkt wird die Ulzeration des Epithels analysiert.

2 Literaturüberblick

2.1 Bedeutung von Tumorerkrankungen

Jährlich treten in Deutschland ca. 230.500 Neuerkrankungen an Krebs bei Männern und 206.000 bei Frauen auf. In den industrialisierten Ländern Mitteleuropas und Nordamerikas sind Tumorerkrankungen hinter Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache (GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND 2008).

Bei Hund und Katze sind Malignome eine der häufigsten Todesursachen. An den Folgen eines Tumorleidens sterben etwa 50% aller Hunde über zehn Jahre. Mittlerweile besitzen die Haustiere in der Bevölkerung einen sehr hohen Stellenwert. Viele Tierbesitzer sind bereit, unabhängig von den entstehenden Kosten eine medizinisch optimale, möglichst kurative Versorgung ihres Tieres auch im Falle einer Krebserkrankung zu tragen (DORSCH 2002, STEBBINS et al. 1989).

2.2 Bedeutung von Kopf-Hals-Tumoren

Zu Kopf-Hals-Tumoren werden alle bösartigen Neubildungen der Lippe, der Zunge, des Mundhöhlenbodens, des Gaumens, der Speicheldrüsen oder des Rachens gezählt. Daran erkranken in Deutschland jährlich etwa 7600 Männer und etwa 2800 Frauen. Kopf-Hals-Tumoren stehen hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit bei Männern an siebter, bei Frauen an 15. Stelle. Die Lebenserwartung verringert sich durch orale Malignome bei Männern um durchschnittlich elf Jahre und bei Frauen um neun Jahre (GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND 2008).

Haupttrisikofaktoren sind Tabak- und Alkoholkonsum. Raucher erkranken bis zu sechsmal häufiger an bösartigen Tumoren des Mund- und Rachenraumes als Nichtraucher; zusätzlicher Alkoholkonsum verstärkt dieses Risiko deutlich. Neben einer unzureichenden Mundhygiene wird auch eine Beteiligung von Viren zu den Ursachen gezählt.

In der Veterinärmedizin kommen Tumoren der Mundhöhle ebenfalls häufig vor. Bei der Katze sind es etwa 10% aller Tumoren (STEBBINS et al. 1989). Sie liegen damit an vierter Stelle hinter den Tumoren der lymphatischen Organe, der Haut und der Mamma. Katzen im Alter von 2,5 bis 18 Jahren sind betroffen, wobei das Durchschnittsalter bei etwa elf Jahren liegt (HUTSON et al. 1992, POSTORINO REEVES et al. 1993). Die neoplastischen Veränderungen sind zu 75% Plattenepithelkarzinome (KESSLER 2005), der Rest Fibrosarkome (KRAFT u. DÜRR 1996). Andere Tumoren, wie Osteosarkome von Maxilla oder Mandibula, Adenokarzinome der Speicheldrüsen, odontogene Tumoren (Ameloblastom, Fibrodentom) oder Mastzelltumoren sind wesentlich seltener (KRAFT u. DÜRR 1996).

Beim Hund sind etwa 75% aller tumorösen Veränderungen der Mundhöhle bösartig. Am häufigsten finden sich Melanome, Plattenepithelkarzinome und Fibrosarkome. Gutartige tumoröse Veränderungen sind Papillome, Epuliden und Odontome (KESSLER 2005, NIEMAND u. SUTER 2001, TODOROFF u. BRODEY 1979). Der Altersdurchschnitt bei Hunden für eine Erkrankung an einem malignen Melanom wird mit zwölf Jahren (1 bis 17 Jahre), einem oralen Plattenepithelkarzinom mit neun Jahren (1,2 bis 14 Jahre) und einem Fibrosarkom mit acht Jahren (0,5 bis 15 Jahre) angegeben. Besonders männliche Tiere sind von

malignen Melanomen und Plattenepithelkarzinomen betroffen (KESSLER 2005, TODOROFF u. BRODEY 1979).

2.3 Therapieoptionen bei Kopf-Hals-Tumoren

Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin beruht die Therapieentscheidung bei Kopf-Hals-Tumoren auf einer exakten Diagnose der Erkrankung bezüglich Art, Lokalisation, Ausdehnung und Metastasierung. Als wesentliche Optionen stehen Operation, Strahlen- oder Chemotherapie zur Verfügung. Diese werden allein oder auch in Kombination angewendet (NIEMAND u. SUTER 2001). Die Behandlung kann grundsätzlich kurativ, mit dem Ziel der Heilung, als auch palliativ, zur Eindämmung der Symptomatik und Verbesserung der Lebensqualität für einen begrenzten Zeitraum, erfolgen. Primäre Therapie ist in der Regel die Operation. Patienten mit einem Karzinom im Kopf-Hals-Bereich erhalten in mehr als 40% der Fälle eine adjuvante oder alleinige kurative Strahlentherapie (HOWALDT u. KAINZ 1997).

Auch bei Hund und Katze steht die chirurgische Behandlung an erster Stelle. Durch die engere Bindung des Tieres an den Menschen werden jedoch zunehmend auch weitere Therapieformen, wie die Chemo- und Radiotherapie, gefordert (NIEMAND u. SUTER 2001).

Zur objektiven Beschreibung von Tumorerkrankungen dient das „TNM-System“ (UICC 2002). TNM ist eine Abkürzung für: Tumor (*T*) zur Beschreibung von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors, Nodes (*N*, Lymphknoten) für Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen, und Metastasen (*M*) für Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen.

Die Bewertung des Primärtumors wird in vier Stadien von T1 bis T4 vorgenommen. Ist kein Primärtumor vorhanden bzw. ist dieser operativ entfernt, lautet die Kategorie T0. Die Bewertung der regionären Lymphknoten erfolgt in drei Stadien von N1 bis N3 in Abhängigkeit von der Befallshäufigkeit. N0 bezeichnet den Nichtbefall der Lymphknoten. Das Vorhandensein von Fernmetastasen wird mit M1 bezeichnet, das Fehlen mit M0. In allen drei Kategorien gibt es weitere differenzierte Einteilungen.

Die Wirkung einer onkologischen Therapie auf Tumoren kann anhand verschiedener Parameter beurteilt werden. Als Remission (Tumorschrumpfung) wird die makroskopische Verkleinerung des Tumors bezeichnet. Diese kann partiell (Volumenminderung um mindestens 50% über eine Dauer von mindestens 4 Wochen) oder komplett (keine makroskopisch nachweisbaren Tumorreste) sein. Die lokale Tumorkontrolle (Rezidivfreiheit über einen definierten Zeitraum, in der Humanmedizin in der Regel 5 Jahre) ist das Ziel der kurativen Strahlentherapie. Mit zunehmender Gesamtdosis der Bestrahlung steigt der Anteil lokal kontrollierter Tumoren an, es ergibt sich eine typische, sigmoide Dosiseffektkurve. Die 50%-Tumorkontrolldosis (TCD50, tumor control dose 50%) ist diejenige Dosis, die notwendig ist, um 50% der Tumoren lokal zu kontrollieren. Als Rezidiv wird ein histologisch gleichartiger Tumor am Ort oder in den direkten Lymphabflusswegen des ursprünglichen Tumors bezeichnet.

Ein weiteres Maß für die Wirksamkeit einer onkologischen Therapie ist die Überlebensrate, d.h. der prozentuale Anteil an Patienten mit einer Tumorerkrankung, der ein bestimmtes Zeitintervall nach einer Therapie überlebt. Die Überlebensdauer ist diejenige Zeitspanne, über welche ein tumorkranker Patient nach Beginn der Therapie überlebt.

2.3.1 Chirurgische Therapie

Da beim Tier Tumoren generell oft sehr spät diagnostiziert werden und meist schon eine Metastasierung vorhanden ist, ist eine alleinige chirurgische Therapie selten erfolgreich (NIEMAND u. SUTER 2001). Liegt dennoch ein operativ gut zugänglicher Tumor (T1, T2) ohne Lymphknotenbefall (N0) vor, so ist die totale Extirpation die Methode der Wahl. Neoplasien der Mundhöhle sollten möglichst radikal, mit einem Sicherheitsabstand im gesunden Gewebe von mindestens 1-2 cm, entfernt werden. Bei einem zusätzlichen Befall der regionalen Lymphknoten muss das Lymphabflußgebiet in die Operation einbezogen werden (EHRENFELD u. PREIN 2002, KESSLER 2005, NIEMAND u. SUTER 2001).

2.3.2 Chemotherapie

Die Chemotherapie ist neben der Chirurgie und der Radiotherapie eine wichtige Behandlungsmöglichkeit bei Tumorerkrankungen in der Human- und Tiermedizin. Eingesetzt werden Chemotherapeutika als alleinige Therapie oder in Kombination mit den anderen Therapieoptionen (KESSLER 2005a, NIEMAND u. SUTER 2001). Dabei hat die alleinige Chemotherapie rein palliativen Charakter und führt bei soliden Tumoren, mit wenigen Ausnahmen, nicht zur Heilung. Rationale für den Einsatz der Chemotherapie in kurativen Protokollen ist einerseits die Bekämpfung von (Mikro-)Fernmetastasen, andererseits die zusätzliche Zellabtötung im Primärtumor. Die Auswahl des geeigneten Chemotherapeutikums beruht auf der spezifischen Empfindlichkeit des Tumors, dem Allgemeinzustand und der Organfunktion (v.a. Leber, Niere) des Patienten.

Die Wirkung von Chemotherapeutika beruht auf einer Proliferationshemmung oder Abtötung von aktiv proliferierenden Zellen. Zu diesen Zellen gehören neben der Wachstumsfraktion des Tumors auch „normale“ Zellpopulationen, wie im Knochenmark, in den Schleimhäuten im oberen und unteren Gastrointestinaltrakt und in der Haut mit ihren Anhangsgebilden. Daraus ergeben sich die entsprechenden Nebenwirkungen der Chemotherapie (KESSLER 2005a).

In der Humanmedizin erfolgt die Chemotherapie in der Regel entsprechend definierter, Evidenz basierter Protokolle. Häufigste Präparate bei Kopf-Hals-Tumoren sind 5-Fluoro-Uracil (5-FU), cis-Diamin-Dichlor-Platin (cDDP) und Mitomycin C (MMC). In der Tiermedizin existieren dagegen sehr variable Behandlungsprotokolle und Dosierungsangaben. Deshalb sollte gemäß der Erfahrung des behandelnden Tierarztes individuell ein geeigneter Therapieplan für jeden Patienten entsprechend der Diagnose gestellt werden (KESSLER 2005, NIEMAND u. SUTER 2001).

2.3.3 Strahlentherapie

Das Ziel einer kurativen Strahlentherapie ist die vollständige Zerstörung aller teilungsfähigen Tumorzellen, bei gleichzeitiger Schonung der umliegenden gesunden Gewebe. In vielen klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen wird gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit der lokalen Tumorkontrolle abhängig ist vom Volumen, der Ausbreitung (TNM-Stadium), den histologischen Charakteristika des Tumors und vor allem auch von der applizierten Strahlendosis (HERRMANN et al. 2006).

Die kurative Bestrahlung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich kann als alleinige oder adjuvante Behandlung durchgeführt werden. Kleine Tumoren der Mund- und Rachenhöhle ohne

Absiedlung in die regionären Lymphknoten können, alternativ zur Operation, mit einer alleinigen definitiven Strahlentherapie behandelt werden. Eine kombinierte Behandlung aus Operation und Bestrahlung ist bei fortgeschrittenen, aber noch operablen Tumoren in jedem Falle anzustreben. Die Bestrahlung kann präoperativ erfolgen, um die Tumormasse auf ein operables Niveau zu reduzieren und peripher gelegene Zellen zu vernichten, oder postoperativ, um verbliebene Tumorzellen im Tumorbett und in den regionären Lymphknoten zu zerstören (HERRMANN et al. 2006, KASER-HOTZ 2001, 2005, NIEMAND u. SUTER 2001).

Bei der palliativen Strahlentherapie ist die Beseitigung umschriebener, symptombezogener Beschwerden und damit der Erhalt der Lebensqualität, gegebenenfalls in Verbindung mit einer Lebensverlängerung das Ziel. Die Strahlentherapie von oralen Plattenepithelkarzinomen und Melanomen hat den Vorteil, dass eine dauerhafte Verunstaltung des Patienten vermieden werden kann. Außerdem ist die Sanierung der regionären Lymphknoten möglich (KESSLER 2005).

Bei jeder Bestrahlung müssen gesunde Gewebestrukturen in den Hochdosisbereich einbezogen werden. Dazu zählen normale Strukturen im Tumor selbst, im Bereich des möglicherweise mikroskopisch infiltrierten umgebenden Gewebes und im Ein- und Austrittskanal der Strahlung. Das Zielvolumen einer kurativen Strahlentherapie beinhaltet somit einen beträchtlichen Anteil an gesundem Normalgewebe. Dadurch kann es zu frühen und chronischen Nebenwirkungen kommen, die im Rahmen einer aggressiven und damit erfolgversprechenden Strahlentherapie die dosislimitierende Rolle spielen. Ein gewisses Risiko schwerer Strahlenfolgen ist der Preis für die optimale Chance einer Heilung von der Krebserkrankung. Frühe und chronische Strahlenfolgen an Normalgeweben sind, solange sie eine allgemein akzeptierte Häufigkeit nicht überschreiten, notwendige Folge einer effektiven kurativen Strahlentherapie (DÖRR et al. 2005).

2.3.3.1 Radiotherapie-Protokolle

Grundsätzlich findet die Strahlentherapie von soliden Malignomen als fraktionierte Bestrahlung in mehreren Bestrahlungssitzungen statt. In Bezug auf die Fraktionierungsprotokolle unterscheidet man die konventionelle Bestrahlung, die Hyperfraktionierung, die akzelerierte Fraktionierung, die akzelerierte Hyperfraktionierung und die Hypofraktionierung. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Parameter der unterschiedlichen Bestrahlungsprotokolle im Vergleich zur konventionellen Behandlung zusammengefasst.

Tab. 1: Bestrahlungsprotokolle (DÖRR et al. 1996a)

Fraktionierungsprotokoll	Dosis pro Fraktion [Gy]	Fraktionen [Woche]	Wochendosis [Gy]	Gesamt-Dosis*	Gesamt-Dauer*
Konventionell	1,8-2,0	5	9-10	1	1
Hyperfraktioniert	1-1,2	↑	<12,0	↑	=
Akzeleriert	1,8-2,0	↑	>12,0	=/↓	↓
Akzeleriert-hyperfraktioniert	1-1,6	↑	>12,0	=/↓	↓
Hypofraktioniert	>3,0	variabel	variabel	↓	↓

* in Relation zur konventionell fraktionierten Bestrahlung

Konventionelle Fraktionierung

Bei der konventionellen Fraktionierung wird an 5 Tagen in der Woche je eine Dosis von 1,8 bis 2,0 Gy verabreicht. Die Wochendosis beträgt somit 9 bis 10 Gy. Der Gesamtbehandlungszeitraum erstreckt sich über 6 bis 7 Wochen, so dass eine Gesamtdosis von 60-70 Gy erreicht wird (DÖRR et al. 1996a, HERRMANN et al. 2006).

Hyperfraktionierung

Im Rahmen einer hyperfraktionierten Behandlung wird eine größere Anzahl kleinerer Fraktionen mit Dosen zwischen 1,0 und 1,2 Gy verabreicht. Die Gesamtbehandlungszeit und die Gesamtdosis bleiben bei der reinen Hyperfraktionierung gegenüber der konventionellen Fraktionierung unverändert (DÖRR et al. 1996a). Spät reagierende Normalgewebe werden im Vergleich zum Tumor durch die Verringerung der Dosis pro Fraktion auf Grund der besseren Erholungskapazität (siehe Kap. 2.8.2) bevorzugt geschont. Üblicherweise wird jedoch in der klinischen Praxis die Gesamtdosis um 15-20% erhöht (DÖRR et al. 1996a). Randomisierte Studien zur dosiserhöhten hyperfraktionierten Strahlentherapie bei Kopf-Hals-Tumoren zeigen eine signifikante Erhöhung der lokoregionären Kontrolle im Vergleich zur konventionellen Fraktionierung. Diesem Gewinn steht – auf Grund der Dosiserhöhung – eine stärker ausgeprägte Reaktion der Schleimhäute gegenüber. Da die Mukosiden zu konsekutiven Spätschäden führen können, war in einigen Studien (HORIOT et al. 1997) die Rate an Spätfolgen in der Mundhöhle signifikant erhöht oder zumindest nicht soweit verringert, wie dies auf Grund strahlenbiologischer Abschätzungen durch die reduzierte Fraktionsdosis zu erwarten gewesen wäre.

Akzelerierte Fraktionierung

Unter der reinen akzelerierten Strahlentherapie versteht man die Behandlung mit konventionellen Dosen pro Fraktion in einer verkürzten Gesamtbehandlungszeit, d.h. mit einer erhöhten Dosis pro Woche. Dafür werden entweder mehrere Fraktionen pro Tag oder zusätzliche Bestrahlungen am Wochenende appliziert. Das Ziel ist die Verminderung der strahleninduzierten Regeneration („Repopulierung“) des Tumorgewebes. Bei allen akzelerierten Bestrahlungsschemata ist die akute Schleimhauttoxizität signifikant erhöht, da hier die Möglichkeit zur Repopulierung (siehe Kap. 2.8.3) ebenfalls vermindert wird. Bei sehr stark akzelerierten Behandlungskonzepten muss deshalb die Gesamtdosis gesenkt werden, um die Strahlentoleranz der Schleimhäute nicht zu überschreiten.

Eine weitere Art der Akzelerierung ist die begleitende Boostbestrahlung (SCHMIDT-ULLRICH u. MORRIS 2001, DÖRR et al. 1996a), bei der neben der konventionellen Bestrahlung in den letzten 2-2,5 Behandlungswochen täglich eine zusätzliche Fraktion, meist auf ein verkleinertes Volumen, appliziert wird.

Akzelerierte Hyperfraktionierung

Die Kombination aus akzelerierter und hyperfraktionierter Bestrahlung gewinnt zunehmend an klinischer Bedeutung. Es sollen die Vorteile beider Therapiestrategien miteinander verbunden werden: Die Dosis pro Fraktion ist gegenüber der konventionellen Bestrahlung verringert (1,0-1,6 Gy), um die Erholungseffekte bei chronisch reagierenden Normalgeweben zu nutzen (siehe Kap. 2.8.2). Die wöchentliche Dosis ist für eine Verkürzung der Gesamtbe-

handlungszeit erhöht, um Repopulierungsprozessen im Tumor entgegenzuwirken. Täglich werden zwei bis drei Fraktionen verabreicht, wodurch die Gesamtbehandlungszeit auf deutlich unter 7 Wochen verkürzt wird.

Der Abstand zwischen den Fraktionen sollte mindestens 6 Stunden betragen, um die vollständige Erholung in den Normalgeweben zu gewährleisten (siehe Kap. 2.8.2). Um die frühen Nebenwirkungen in tolerablen Grenzen zu halten, wird die Gesamtdosis in der Regel verringert.

Es gibt verschiedene Bestrahlungsschemata: Eine einfache Möglichkeit ist die Behandlung an sechs statt 5 Tagen pro Woche mit 2 Gy/Fraktion (SCHMIDT-ULLRICH u. MORRIS 2001). Häufiger wird eine zweimalige Behandlung pro Tag mit 1,2 bis 1,6 Gy angewandt (DÖRR et al. 1996a, SCHMIDT-ULLRICH u. MORRIS 2001). Bei einer akzelerierten hyperfraktionierten Boosttherapie wird nach einer Standardbehandlung mit 1,8 Gy pro Tag nach etwa 2/3 der vorgesehenen Gesamtdosis eine akzelerierte hyperfraktionierte Bestrahlung mit zwei täglichen Fraktionen von 1,6 Gy durchgeführt (SCHMIDT-ULLRICH u. MORRIS 2001).

Hypofraktionierung

Unter Hypofraktionierung versteht man die Applikation einer im Vergleich zu konventionellen Protokollen verminderten Anzahl von Fraktionen mit Dosen von mehr als 2 Gy pro Fraktion. Als kurative Therapie wird die Hypofraktionierung im „Manchester-Protokoll“ angewendet. Dabei wird eine Fraktionsdosis von 3 Gy und eine Gesamtdosis von ca. 40-50 Gy appliziert. Die Gesamtbehandlungszeit beträgt 3 Wochen (DÖRR et al. 1996a). Weiterhin findet die Hypofraktionierung Anwendung im Rahmen von palliativen Maßnahmen, als präoperative Bestrahlung sowie bei der Behandlung von Melanomen und in neueren Studien auch von Prostatakarzinomen und Mammatumoren (DÖRR et al. 1996a, MOTT et al. 2004). Durch eine Verringerung der Gesamtdosis wird den Nebenwirkungen entgegengewirkt.

Brachytherapie

Weitere Behandlungsmöglichkeiten von Tumoren der Mundhöhle, die auch in der Tiermedizin Anwendung finden, sind die intrakavitäre und die interstitielle Strahlentherapie. Beide Formen gehören zur Brachytherapie, bei der eine umschlossene radioaktive Quelle in unmittelbarer Nähe des Tumors positioniert wird. Im Gegensatz zur perkutanen Strahlentherapie ist durch die Brachytherapie häufig eine bessere Schonung der Kieferknochen und der Zähne möglich und die Gefahr der Ausbildung einer Osteoradionekrose wird verringert. Der Grund dafür ist der starke Dosisabfall mit der Entfernung von der Quelle. Bei der intrakavitären Brachytherapie werden umschlossene Strahler in vorhandene oder künstliche (Operation) Körperhöhlen eingebracht. Aus Strahlenschutzgründen wird das Nachladeverfahren (Afterloading) eingesetzt: Mittels Ultraschall-, MRT- oder CT-Kontrolle wird ein Applikator in das Zielgebiet eingebracht. Anschließend wird die Quelle ferngesteuert mittels eines Drahtes in den Applikator vorgeschoben. Dort wird sie gemäß dem Bestrahlungsplan zur optimalen Dosisverteilung für entsprechend lange Zeiten an verschiedenen Stellen positioniert und abschließend wieder entfernt. So kann eine individuell angepasste Dosisverteilung erreicht werden.

Im Rahmen der Brachytherapie von Kopf-Hals-Tumoren kommt zudem die interstitielle Implantation von Quellen („Seeds“) zum Einsatz (ZIMMERMANN et al. 2003). Das interstitielle

Verfahren wird vorwiegend bei Tumoren der Lippe, der Zunge und des Mundbodens eingesetzt. Bei kleinen Tumoren kann es als alleinige Therapie eingesetzt werden, bei größeren zur lokalen Dosisaufsättigung.

2.3.4 Strahlentherapie in der Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin gewinnt die Bestrahlung immer mehr an Bedeutung und wird auch zunehmend von Tierbesitzern nachgefragt. Grundsätzlich gelten die Prinzipien der Strahlentherapie aus der Humanmedizin. Die Behandlungsschemata sind jedoch noch uneinheitlich (KASER-HOTZ 2001, 2005, NIEMAND u. SUTER 2001). Es muss die Zahl der Narkosen und die Hospitalisationszeit bei den Behandlungsprotokollen beachtet werden. Während in der Humanmedizin kurative Protokolle bei täglicher Bestrahlung über 6 bis 7 Wochen durchgeführt werden können, ist dies in der Tiermedizin kaum möglich. Es werden häufig Protokolle angewandt, in denen 10-12 Fraktionen von 4 bis 5 Gy mit Gesamtdosen zwischen 48 und 57 Gy verabreicht werden. Die Bestrahlungen finden in der Regel dreimal pro Woche nach einem Montag Mittwoch Freitag-Schema statt. Mittlerweile wird jedoch auch in der Veterinärmedizin versucht, an 5 Tagen in der Woche zu bestrahlen. Die Brachytherapie gewinnt ebenfalls zunehmend an Bedeutung.

Im Folgenden sollen beispielhaft Indikationen zur strahlentherapeutischen Behandlung mit den entsprechenden Studienprotokollen vorgestellt werden, ohne dass Anspruch auf Vollständigkeit erhoben wird. Anzumerken ist, dass es sich häufig um Anwendungsberichte ohne entsprechende Kontrollgruppen handelt, so dass der Erfolg der Bestrahlung schwer einzuschätzen ist.

Mundhöhlentumoren der Katze

Eine Übersicht über die Strahlentherapie-Studien bei Mundhöhlentumoren der Katze gibt Tabelle 2. Die oralen Plattenepithelkarzinome der Katze weisen generell eine ungünstige Prognose auf. Katzen tolerieren zudem eine aggressiv ausgerichtete chirurgische Resektion schlecht. In den meisten Fällen sind deswegen kurative Therapieansätze nicht indiziert (KESSLER 2005, KLEITER 2006).

Die in Tabelle 2 aufgeführten Studien zeigen, dass die Kombination verschiedener Therapiemöglichkeiten, z.B. Chirurgie und Radiotherapie, zu den besten Therapieergebnissen führt. Der Nachteil einer Operation ist jedoch, dass mit zunehmender Entfernung von Gewebe die Morbidität zunimmt. Grundsätzlich ist es schwierig, nach der Resektion des Primärtumors eine Rekonstruktion durchzuführen (KESSLER 2005).

Die Studie von THEON et al. (1996) zeigt, dass das Rezidivrisiko bei Tumoren mit einer hohen proliferativen Aktivität durch eine tägliche Bestrahlung, und damit einer kürzeren Gesamtbehandlungszeit, gesenkt werden kann. Die Strahlenfolgen bei täglicher Bestrahlung mit 3,3 Gy limitieren jedoch den Behandlungserfolg. Beim Einsatz von kleineren Fraktionen könnte es zu einer Milderung der Nebenwirkungen kommen (siehe Kap. 2.8.2).

Tab. 2: Übersicht zur Strahlentherapie von oralen Plattenepithelkarzinomen (PEK) und Melanomen bei Katzen (modifiziert nach DORSCH 2002)

Quelle	Tumor-Lokalisation/-art (n)	Fälle	Gesamtdosis [Gy]/ Gesamtbehandlungs- zeit	Fraktionierung [F]	Zusätzliche Therapien	Ergebnisse*
EVANS et al. 1991	PEK: Wange (1), lingual/ sublingual (7), Maxilla/ Mandibula (3)	11	52/4 Wochen (MMF)	12x4,3 Gy	Etanidazol intratumoral	Überlebenszeit: 116 d (19-389 d)
HUTSON et al. 1992	PEK: Mandibula (7)	7	43/5 Wochen (DF)	10x4,3 Gy	Hemimandibul-, rostrale Mandibulektomie	Überlebenszeit: 14 Monate (3-36 Monate)
OGILVIE et al. 1993	PEK: Zunge (4), Maxilla/ Mandibula (7)	11	44-65/3 Wochen	10-15x4,4 Gy	Mitoxantron (11)	CR: 170 d (28-485 d)
POSTORINO REEVES et al. 1993	PEK: Gaumen (3), Man- dibula/Maxilla (28), Tonsillen (22)	45 (mit OP 52)	40-48/3-4 Wochen (MMF)	10-12x4 Gy,	Chemotherapie (11) lokale Hyperthermie (10)	Überlebenszeit: alle Katzen: 3,2 Monate OP: 1,5 / RT: 3 Monate RT + CT: 2,5 Monate RT + HAT: 2,5 Monate
THEON et al. 1996	PEK: Gingiva (19), Sublingual (13), Gaumen (3)	35	Gruppe 1: (MMF) 48/2,5 Wochen Gruppe 2: (täglich) 50-60/3-4 Wochen	Gruppe 1: 10x4 Gy Gruppe 2: 15-18x3,3 Gy	k.A.	abhängig von PF: Rezidivrisiko für Gruppe 1 PF>34%: 2,3fach erhöht PF<34%: 1,4fach erhöht
BREGAZZI et al. 2001	PEK: Manibula (6), Frenulum (1)	7	palliativ 24/d 0, 7, 21	3x8 Gy	Mitoxantron (1) Piroxicam (3)	Überlebenszeit: 60 d (42-97 d)
FIDEL et al. 2007	PEK	9	49/9 d, 2x täglich aller 6 Stunden	14x3,5 Gy	k.A.	Überlebenszeit: 86±110 d inkomplett**(6): 60±7 d komplett**(3): 298±187 d
FARRELLY et al. 2004	Melanom	5	24/d 0, 7, 21 oder 0, 7, 13	3x8 Gy	zusätzliche RT (1) Chemotherapie (2)	Überlebenszeit: 146 d (66-224 d)

CR = complete remission; d = Tage, D, F = Dienstag und Freitag; HT = lokale Hyperthermie; k.A. = keine Angaben aus der Literatur; MMF = Montag-Mittwoch-Freitag; OP = Operation; PF = proliferativer Faktor; F = Fraktion, CT = Chemotherapie
bei Überlebenszeiten und Remission Angabe des Medians, Spanne angegeben, sofern der Literaturstelle zu entnehmen, **Rückgang des Tumors

Mundhöhlentumoren des Hundes

Eine Übersicht über die Strahlentherapie-Studien bei Mundhöhlentumoren des Hundes geben die Tabellen 3 und 4. Die Größe des Primärtumors, die lokale Tumorkontrolle und das Vorhandensein von Fernmetastasen haben einen signifikanten Einfluss auf den Therapieerfolg (DEWHIRST et al. 1985, THEON et al. 1997a). Bei ca. 50% der Patienten mit malignen Melanomen ist die Ausbildung von Lungenmetastasen der Grund für eine Euthanasie (BLACKWOOD et al. 1996). Die Langzeitprognose könnte mit geeigneten Chemotherapieprotokollen zur systemischen Behandlung von Metastasen in Kombination mit lokaler Therapie verbessert werden.

Die Radiotherapie bei tonsillären Plattenepithelkarzinomen ist nur als palliative Maßnahme oder kurativ in Verbindung mit einer systemischen Chemotherapie zur lokalen Tumorkontrolle geeignet (BATEMAN et al. 1994b, BROOKS et al. 1988). Der Grund dafür ist, dass bei Diagnosestellung solcher Tumoren schon zu 90% Metastasen vorhanden sind (TODOROFF u. BRODEY 1979). MACMILLAN et al. (1982) kann nach Tonsillektomie und Radiotherapie eine mittlere Überlebenszeit von 110 Tagen feststellen. Trotzdem hat die palliative Bestrahlung von Patienten mit Tumormetastasen eine wichtige Bedeutung als adjuvante lokale Therapie. Innerhalb kurzer Zeit erreicht BATEMAN et al. (1994b) eine Schmerzfreiheit bei den Patienten.

Ein Vergleich der verschiedenen Studien über die Strahlentherapie von nicht-tonsillären oralen Plattenepithelkarzinomen ist schwierig. Schon innerhalb kleiner Patientengruppen werden große Dosisvariationen angewendet. Tumoren, die sich rostral in der Mundhöhle befinden, haben allgemein eine bessere Prognose, als Tumoren im rostro-kaudalen und kaudalen Bereich (EVANS u. SHOFR 1988).

Die Bewertung radiotherapeutischer Erfolge bei der Behandlung oraler Fibrosarkome ist ebenfalls schwierig, da es sich auch hier ausschließlich um sehr kleine Patientengruppen mit großen adjuvanten Therapievariationen und uneinheitlicher Lokalisation der Tumoren handelt (BREWER u. TURREL 1982, CIEKOT et al. 1994, THRALL 1981). Therapiekombinationen können den Behandlungserfolg von operativ schlecht zugänglichen Tumoren verbessern. Orale Fibrosarkome haben eine deutlich schlechtere Prognose als Weichteilsarkome anderer Lokalisationen. Im Vergleich zu einer medianen Überlebenszeit von 6,2 Jahren überleben Patienten nach postoperativer Bestrahlung im Mundbereich durchschnittlich nur 1,5 Jahre (FORREST et al. 2000).

Die aufgeführten Studien von THEON et al. (1997b) und THRALL (1984) belegen, dass die Bestrahlung von akanthomatösen Epuliden eine sehr effektive Behandlungsmethode ist. Bei Hunden mit weit kaudal in der Mundhöhle gelegenen Tumoren, die schlecht zu resezieren sind, verspricht die Radiotherapie sehr gute Erfolge. Die Kombination aus chirurgischer Exzision und Bestrahlung hat kurative Chancen (WHITE 1991).

Tab. 3: Strahlentherapie kaniner Mundhöhlentumoren (modifiziert nach DORSCH 2002)

Quelle	Tumor-Lokalisation/-art (n)	Fälle	Gesamtdosis [Gy]/ Gesamtbehandlungs- zeit	Fraktionierung [F]	Zusätzliche Therapien	Ergebnisse*
BREWER u. TURREL 1982	FSA : Gaumen, Maxilla	6	32-48/2,7-4 Wochen (MMF)	8-12x4 Gy	HT (6)	Überlebenszeit: 38-790 d
CIEKOT et al. 1994	FSA: Maxilla, Mandibula	14	40-54/3-5 Wochen MMF oder 5mal/Woche	10-15x3,3-4 Gy	lokale HT (3), OP (2), CT (2), OP + CT (2)	Überlebenszeit: 30-641 d
FORREST et al. 2000	FSA	7	42-57 Gy	10-19x3-4,2 Gy	OP (unvollstän- dig)	Überlebenszeit**: 549 d
POIRIER et al. 2006	FSA	31	kurativ (20): 52,5 Gy palliativ (11): 24 + 30 Gy	k.A. 3x8 Gy, 5x6 Gy	keine	Überlebenszeit: kurativ 331 d palliativ 310 d
SIMON et al. 2007	FSA	39	51/17 d	17x3 Gy	OP, Doxorubicin	Rezidive: nach 213 d Metastasen: nach 276 d
THRALL 1981	FSA: Gingiva (17), Gaumen (1)	17	40-54,5/3-3,5 Wochen (MMF)	10x4,0-5,5 Gy	OP (3)	Überlebenszeit: 122 d (0-732 d)
BROOKS et al. 1988	tonsilläres PEK	6	45-50/5,5 Wochen 2mal/Woche	10-11x4,5 Gy	OP + CT	Überlebenszeit: 270 d (90-665 d)
MACMILLAN et al. 1982	tonsilläres PEK	8	35-42/3,3 Wochen (MMF)	10x3,5-4,2 Gy	Tonsillektomie (8)	Überlebenszeit: 110 d (44-631 d)
EVANS u. SHOFER 1988	PEK: Maxilla (16), Mandibula (8), Zunge (5), Andere (4)	33	GD>38,5 Gy (24) GD<38,5 Gy (9)	k.A.	keine	Überlebenszeit** rostral:16/kaudal:12Monate rostral + kaudal: 1,5 Monate
LADUE MILLER et al. 1996	PEK: Maxilla (6), Mandibula (6), Zunge (1), Gaumen (1)	14	48 oder 57 Gy	12-19x3-4 Gy	HT(1), HT+CT(1) systemische HT + CT (1), CT (1)	Überlebenszeit: 450 d (MW 755±146 d)
BATEMAN et al. 1994a	maligne Melanome	18	24/d 0, 7, 21	3x8 Gy	k.A.	CR: 9/18 PR: 5/18 Hunden 5/18 nach 275-580 d noch am Leben
BLACKWOOD u. DOBSON 1996	maligne Melanome	36	36/d 0, 7, 14, 21	4x9 Gy	k.A.	Überlebenszeit: CR: 259 d (35-1491 d) PR: 140 Tage (70-266 d)

Tab. 4: Fortsetzung Strahlentherapie kaniner Mundhöhlentumoren

Quelle	Tumor-Lokalisation/-art (n)	Fälle	Gesamtdosis [Gy]/ Gesamtbehandlungs- zeit	Fraktionierung [F]	Zusätzliche Therapien	Ergebnisse*
DEWHIRST et al. 1985	maligne Melanome	29	36/4 Wochen 2mal/Woche	8x4,5 Gy	RT + lokale HT (17)	RT: CR 2/12, PR 10/12 RT + HT: CR 12/17, PR 3/17
FREEMAN et al. 2003	maligne Melanome	39	36/6 Wochen 1mal/Woche	6x6 Gy	OP (unvollständig) Cisplatin, Carboplatin	Überlebenszeit: 363 d lokale Rezidive bei 15% nach 139 d Metastasen bei 51% nach 311 d
KING et al. 1999	maligne Melanome	69	36/6 Wochen 1mal/Woche	6x6 Gy	Cisplatin (69) Operation (50)	Überlebenszeit CT + OP + RT: 273 d (52-2163 d) CT + RT: 140 d (46-946 d)
PROULX et al. 2003	maligne Melanome	140	36 Gy 30 Gy >45 Gy	4x9 Gy 3x10 Gy 12-19x2-4 Gy	CT	Überlebenszeit: 7 Monate (6-9 Monate)
THEON et al. 1997b	akanthomatöse Epulitiden	39	48/4 Wochen (MMF)	12x4 Gy	keine	PFS-Rate nach 3 Jahren: 80%
THRALL 1984	akanthomatöse Epulitiden	39	20-70/1-7 Wochen (MMF)	4-21x3,4-5 Gy	keine	CR: 27/39 Überlebenszeit 1129 d (30-3111 d) Überlebensrate (1 Jahr) 85%
GILLETTE et al. 1987	orale Karzinome	38	RT + HT: 25-45 Gy RT: 30-45 Gy	k.A.	HT (17)	TCD50 : RT 38 Gy; RT + HT 33 Gy
THEON et al. 1997a	maligne Melanome (38) PEK (39), FSA (28)	105	48/3 Woche (MMF)	12x4 Gy	k.A.	PFS-Raten nach 1 Jahr/3 Jahren: PEK: 88,9/55,0%, FSA: 76,2/39,8% maligne Melanome: 36,4/20,2%

CR = complete remission; CT = Chemotherapie; d = Tage; DFI = disease free intervall; F = Fraktion; FSA = Fibrosarkom; GD = Gesamtdosis; HT = lokale Hyperthermie; k.A. = keine Angaben aus der Literatur; MMF = Montag-Mittwoch-Freitag; MW = Mittelwert; (n) = Anzahl der Tumoren eines histologischen Typs oder Stadiums; OP = Operation; PEK = Plattenepithelkarzinom; PFS = progression free survival; PR = partielle Remission; RT = Radiotherapie; TCD50 = Bestrahlungsdosis, bei der die Wahrscheinlichkeit für eine lokale Tumorkontrolle nach 1 Jahr 50% ist, * Angabe des Medians und der Spanne, ** Spanne aus Literatur nicht ersichtlich

2.4 Allgemeine Pathogenese der Strahlenreaktion von Normalgeweben

Frühe (akute) Strahlenreaktionen treten während oder in den ersten Wochen nach der Bestrahlung, definitionsgemäß innerhalb der ersten 90 Tage nach Beginn der Therapie, auf (DÖRR et al. 2005, HERRMANN et al. 2006). In der Regel kommen diese in rasch proliferierenden Geweben oder Gewebeanteilen vor. Dazu zählen z.B. die Epidermis, die Schleimhaut des oberen und unteren Gastrointestinaltraktes und das Knochenmark. Bei solchen Mauer- bzw. Umsatzgeweben beruht die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase auf einer ständigen Zellerneuerung (POTTEN u. HENDRY 1983). In Epithelien besteht ein Gleichgewicht zwischen der permanenten Abschilferung oberflächlicher Schichten durch mechanische Beanspruchung bzw. chemischen Stress, und der Zellproduktion in der Germinativschicht. Die Bestrahlung führt zu einer Beeinträchtigung der Zellneubildung. Der Zellverlust an der Oberfläche bleibt aber unbeeinträchtigt. So kommt es zu einer Verminderung der Zahl an funktionellen Zellen (Hypoplasie). Abhängig von der Dosis kann diese Reduktion in Epithelien bis zu einer vollständigen Denudation führen.

Die Frühreaktionen heilen meist vollständig aus (DÖRR et al. 2005). Neben der Mukositis der Mundschleimhaut, welche in Kapitel 2.5 gesondert behandelt wird, gehören zu den wichtigsten frühen Strahlenreaktionen im Kopf-Hals-Bereich die Strahlenreaktion der Epidermis und Geschmacksalterationen (DÖRR et al. 2008, 2005). Die bereits früh beginnende radiogene Mundtrockenheit (Xerostomie) hat eine abweichende pathogenetische Grundlage (DÖRR et al. 2008).

Späte (chronische) Strahlenschäden treten Monate bis viele Jahre nach der Behandlung auf. Die Pathogenese chronischer Strahlenfolgen ist weitaus komplexer, als diejenige der frühen. Es kommt zu pathologischen Veränderungen am Gefäßbindegewebe, die zu dem Leitsymptom der Atrophie führen. Die genauen (molekularen) Mechanismen sind bis heute nur unvollständig geklärt. In der Gesamtheit führen die Veränderungen zu einem Funktionsverlust des betroffenen Gewebes bzw. Organs (DÖRR et al. 2005, HERRMANN et al. 2006). Zu den wichtigsten chronischen Strahleneffekten im Kopf-Hals-Bereich zählen Mundtrockenheit (Radioxerostomie), Strahlenkaries, Osteoradionekrose, Geschmacksverlust (Dys- bzw. Ageusie), Schleimhautatrophie, –ulzeration, –fibrose und Trismus (DÖRR et al. 2008).

In der Mundhöhle treten Interaktionen zwischen den frühen und den chronischen Strahlenfolgen auf, im Sinne von konsekutiven Späteffekten (DÖRR u. HENDRY 2001). Im Rahmen der frühen Strahlenreaktion wird die Schutz- bzw. Barrierefunktion des Epithels beeinträchtigt, so dass an den Zielstrukturen für die chronischen Strahleneffekte (Gefäße, Bindegewebe) zusätzlich zum eigentlichen Strahleninsult weitere chemische und mechanische Schädigungen möglich sind. Dies beeinflusst die Spätreaktion (DÖRR et al. 2005, DÖRR u. HENDRY 2001, DÖRR u. HERRMANN 2003).

2.5 Radiogene Mucositis enoralis – Strahlenreaktion der Mundschleimhaut

2.5.1 Pathogenese und zeitlicher Verlauf

Eine Radio- bzw. Radiochemotherapie im Kopf-Hals-Bereich führt regelmäßig zur Ausbildung einer schwerwiegenden Frühreaktion der Mundschleimhaut, der enoralen Mukositis. Die Strahlenreaktion ist ein komplexes Geschehen, welches aus mehreren Komponenten besteht: Gefäßreaktion, Epithelreaktion, eventuell Sekundärinfektion (Soor, Sepsis) und Heilungsphase (DÖRR 2003b, DÖRR et al. 2005, DÖRR et al. 2007). Unter konventionell

fraktionierter Bestrahlung beginnt die Reaktion in der zweiten Woche. Es kommt zu Rötung und Schwellung im bestrahlten Areal (Gefäßreaktion). In der zweiten bis dritten Behandlungswoche entwickelt sich eine disseminierte Mukositis mit fokalen Erosionen und Ulzerationen (Epithelreaktion), die später in eine konfluente Form übergeht (DÖRR et al. 2005).

Die Mucositis enoralis wird heute als interaktiver Prozess aller Zellpopulationen, wie Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen der Kapillaren und auch Makrophagen, angesehen. Initiiert wird die Strahlenreaktion durch die strahleninduzierte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die direkt oder indirekt zu Schäden an der DNA führen (DÖRR et al. 2007). Innerhalb kurzer Zeit nach der Strahlenexposition wird in verschiedenen mesenchymalen Zellen, wie im Gefäßendothel, der Gefäßmedia und in Makrophagen die Expression pro-inflammatorischer Zytokine induziert. Dabei handelt es sich unter anderem um Interleukin-1 α und Tumornekrosefaktor- α . Die Aktivität der induzierbaren Stickoxidsynthetase und die Prostaglandinsynthese sind erhöht. Innerhalb weniger Stunden erfolgt u.a. die Erhöhung der Expression des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), seines Rezeptors (EGFR) und des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) (DÖRR u. HERRMANN 2003, SONIS et al. 2004).

Die Bedeutung der frühen Gefäßveränderungen für die eigentliche epitheliale Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ist noch unklar; Eine Interaktion ist jedoch anzunehmen (DÖRR u. HERRMANN 2003). Die „Schadensverarbeitung“ ist Gegenstand aktueller Forschungsprojekte. Die regulativen Mechanismen leiten bereits früh auch die kompensatorische Regenerationsantwort der Schleimhaut („Repopulierung“) ein (DÖRR et al. 2007).

Die epitheliale Reaktion der Mundschleimhaut ist die klinisch wichtigste Phase, die durch Zelldepletion zu Erosion und Ulzeration führt. Sie ist typisch für Umsatzgewebe, die den ständigen Zellverlust durch eine permanente Zellproliferation kompensieren (siehe Kap. 2.4). Diese Gewebe besitzen eine ausgeprägte proliferative Hierarchie, bestehend aus Stammzellen, begrenzt teilungsfähigen Zellen (Transitzellen) und differenzierenden, postmitotischen Zellen. Die dosisabhängige Sterilisation von teilungsfähigen (Stamm-)Zellen führt zur Beeinträchtigung der Zellproduktion. Durch den Zellverlust, welcher über weite Dosisbereiche unabhängig vom Strahleninsult fortbesteht (DÖRR 1997a, DÖRR et al. 2007), nimmt die Zellzahl progressiv ab. Bei entsprechend hohen Dosen entsteht eine vollständige Depletion (Ulzeration). Die Latenzzeit bis zum Auftreten des Strahlenulkus entspricht – bei vollständiger Blockade der Zellteilung – mindestens der Zeit zwischen Bildung und Verlust an der Oberfläche (Umsatzzeit). Diese beträgt bei der Maus etwa 5 Tage (DÖRR 1997a, DÖRR 2003b, DÖRR et al. 1993, DÖRR u. KUMMERMEHR 1990) und ist damit mit der Umsatzzeit beim Menschen (DÖRR et al. 1995) vergleichbar. Eine Verlängerung der Latenzzeit über die Transitzeit hinaus entsteht durch die Restproliferation („abortive Teilungen“) geschädigter Zellen. Die durchschnittliche Latenzzeit bis zur Ulzeration bei der Maus beträgt nach Einzelbestrahlung ca. 11 Tage (DÖRR 2003b). Beim Menschen liegt die durchschnittliche Latenzzeit für Ulzerationen der Mundschleimhaut bei 9 Tagen nach Erreichen einer Dosis von 20 Gy (DÖRR 2003a).

2.5.2 Klinische Bedeutung der Mucositis enoralis

Bei der Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren ist die Mundschleimhaut einer der dosislimitierenden Faktoren (DÖRR 1997a, DÖRR et al. 2005, DÖRR et al. 2007, SONIS et al.

2004). Die Radiotherapie im Kopf-Hals-Bereich verursacht bei praktisch allen Patienten eine Mukositis unterschiedlichen Grades. Sie beeinträchtigt signifikant den Allgemeinzustand und die Lebensqualität der Patienten (ARMSTRONG u. McCAFFREY 2006, TROTTI et al. 2003). Wegen der schmerzhaften Reaktion der Mundschleimhaut, die den Patienten am Kauen und Schlucken hindert, muss die Bestrahlung oft für 2-4 Wochen zur Ausheilung unterbrochen werden (DÖRR 2003a, TROTTI et al. 2003). Häufig kommt es zu einem signifikanten Gewichtsverlust. In einer ausführlichen Studie von HERRMANN et al. (1994) wird festgestellt, dass die orale Mukositis in 86% aller Fälle die Ursache einer Behandlungspause ist.

Bei Kopf-Hals-Tumoren sinkt die Heilungsrate mit zunehmender Gesamtbehandlungszeit (FOWLER u. LINDSTRÖM 1992, FU et al. 2000, HERRMANN u. BAUMANN 2005, OVERGAARD et al. 2003). Der Grund dafür sind in den Therapiepausen ungestört ablaufende Proliferationsprozesse der klonogenen Tumorzellen. Zudem beeinflusst das Ausmaß der Frühreaktion im Sinne konsekutiver Spätfolgen auch die Entstehung von Nekrosen, chronischer Ulzera, Ödeme und Fibrosen (DÖRR u. HENDRY 2001, MACIEJEWSKI et al. 1990).

Nicht nur die klinischen sondern auch die sozio-ökonomischen Aspekte der radiogenen Mukositis sind von Bedeutung (ELTING et al. 2007). Die Kosten pro Mukositispatient betragen in einer Analyse aus den USA durchschnittlich 3000-4000 \$ (in einer Spanne von 1700-6000 \$ in Abhängigkeit vom Schweregrad der Mukositis). Diese Werte lassen sich nicht direkt auf das deutsche Gesundheitswesen übertragen, jedoch muss eine vergleichbare Größenordnung angenommen werden. Vorbeugende Maßnahmen zur Einschränkung der Mukositis sind deshalb unbedingt notwendig (ELTING et al. 2007).

2.5.3 Dokumentation

Zurzeit existieren eine Reihe von international anerkannten Systemen zur Klassifizierung der Nebenwirkungen der onkologischen Therapie (RIESENBECK u. DÖRR 1998). Dazu gehören die Protokolle der RTOG/EORTC (Radiation Therapy and Oncology Group/European Organisation for Research and Treatment of Cancer), die CTC (Common Toxicity/Terminology Criteria) des National Cancer Institutes (NCI) der USA, die Klassifikation der WHO (World Health Organisation) und für Spätschäden das LENT-SOMA Schema. Spezifisch für die Mundschleimhaut wurde der Oral Mucositis Assessment Scale (OMAS) entwickelt (SONIS et al. 2004).

Das RTOG/EORTC-System ist besonders für den routinemäßigen Einsatz im klinischen Alltag für die Strahlentherapie und Radiochemotherapie geeignet. Tabelle 5 zeigt die Dokumentation der akuten Strahlenreaktion der Mundschleimhaut.

Tab. 5: RTOG/EORTC-Klassifikation der akuten Nebenwirkungen an der Mundschleimhaut (nach SEEGENSCHMIEDT 1998)

Grad	Kriterium
0	keine Veränderung
1 „leicht“	mildes Erythem, geringe Schmerzen, keine Analgetika nötig
2 „deutlich“	fleckförmige, mäßig schmerzende Mukositis, Analgetika erforderlich
3 „ausgeprägt“	konfluierende Mukositis, starke Schmerzen, Narkotika erforderlich
4 „lebensbedrohlich“	Blutungen, Ulzeration, Nekrosen, ggf. parenterale Ernährung nötig

MACIEJEWSKI et al. (1991) modifiziert das RTOG/EORTC-System unter Einbeziehung der flächigen Ausdehnung der Mukositis. Dabei wird gleichzeitig die Sensitivität des Systems geändert. Die fokale Mukositis wird von MACIEJEWSKI anstelle von Grad 2 mit Grad 3,0 bis 3,5 und die konfluente Mukositis anstelle von Grad 3 mit Grad 4,0 bis 4,5 eingestuft. Bei Verwendung des jeweiligen RTOG/EORTC-Systems sollte deshalb stets die Quelle angegeben werden, um Verwechslungen zu vermeiden (RIESENBECK u. DÖRR 1998).

Weitere Klassifikationssysteme werden vom National Cancer Institute der USA in Form der Common Toxicity/Terminology Criteria (CTC) (NCI 2006) oder der WHO (1979) erstellt. Beide Systeme wurden ursprünglich zur Dokumentation der Nebenwirkungen einer Chemotherapie entwickelt, wurden aber inzwischen so modifiziert, dass die Komplikationen der gesamten onkologischen Therapie erfasst werden können.

Tab. 6: Klassifikationssysteme der WHO und CTC für die orale Mukositis (NCI 2006, WHO 1979)

	WHO	CTC
Grad 0	keine Veränderungen	keine Veränderungen
Grad 1	Entzündung, Rötung	Entzündung, Erythem, schmerzlose Erosion
Grad 2	Erythem, Ulzeration, feste Nahrung möglich	stellenweise Erosionen/Pseudomembran, moderate Schmerzen, feste Nahrung möglich
Grad 3	Ulzeration, nur flüssige Nahrungsaufnahme möglich	konfluente Ulzeration, starker Schmerz, Bedarf flüssiger Kost und Analgetika
Grad 4	orale Ernährung nicht möglich	Nekrosen, Spontanblutungen, orale Nahrungsaufnahme nicht möglich, lebensbedrohlich

Ein weiteres alternatives und detailliertes System entwickelte DISCHE (1988). Diese Klassifikation wurde von RIESENBECK u. DÖRR 1998 veröffentlicht. Die Dokumentation beinhaltet nicht nur objektive morphologische Kriterien, sondern auch die subjektiven Empfindungen der Patienten. DISCHE (1988) schlägt neben den obligaten Bewertungskriterien noch weitere fakultative Merkmale vor, die eine aussagekräftige Beurteilung ermöglichen. Diese Klassifikation der enoralen Mukositis ist aufgrund der Detailgenauigkeit für spezielle klinische Studien zur oralen Mukositis geeignet.

Die OMAS-Klassifikation ist von einem Sachverständigenausschuss zur Bewertung der Mukositis während Chemo- und Radiotherapie entwickelt worden (SONIS et al. 2004). Die OMAS-Klassifikation ist aber im Grunde nur für die Chemotherapie geeignet, da verschiedene Lokalisationen in der Mundhöhle beurteilt werden, unabhängig, ob sie bestrahlt wurden oder nicht.

Das LENT-SOMA-System (LENT = Late Effects in Normal Tissue) erfasst die Späteffekte an Normalgeweben mit den sogenannten SOMA-Kriterien:

- S – subjektive (patientenbezogene) Kriterien;
- O – objektive (untersucherbezogene) Kriterien;
- M – Maßnahmen zur Therapie der Nebenwirkungen;
- A – weitergehende Analyse- bzw. Diagnoseverfahren.

In der Klassifikation sind alle durch eine onkologische Therapie hervorgerufenen Späteffekte dokumentiert. Diese Klassifikation ist auf Grund ihrer Detailgenauigkeit vor allem für klinische Studien geeignet (SEEGENSCHMIEDT 1998, SEEGENSCHMIEDT u. ZIMMERMANN 2000).

2.6 Aufbau und proliferative Organisation der Mundschleimhaut

2.6.1 Allgemeine Anatomie der Mundhöhle und der Zunge

Die Mundhöhle, Cavum oris, wird apikal durch die Lippen (Labia oris), lateral durch die Backen (Vestibulum buccale), nach oben durch den harten Gaumen (Palatum durum) und nach unten durch den Mundhöhlenboden begrenzt. Nach kaudal besteht eine offene Verbindung zur Rachenhöhle. Durch die Zahnbögen des Unter- und Oberkiefers entsteht eine räumliche Teilung der Mundhöhle in das Vestibulum oris (Mundhöhlenvorhof) und das Cavum oris proprium (eigentliche Mundhöhle). Ausgekleidet wird das Cavum oris durch ein mehrschichtiges Plattenepithel, welches auf der Lamina propria, bestehend aus relativ straffem Bindegewebe, aufliegt. Die Zunge (lingua) liegt als muskulöse Platte am Boden der Mundhöhle.

2.6.2 Anatomie der Zunge

Die Zunge wird anatomisch in drei Abschnitte eingeteilt: Zungenspitze (Apex linguae), Zungenkörper (Corpus linguae) und Zungenwurzel (Radix linguae). Die Zunge wird durch eine mediane Längsfurche, den Sulcus medianae linguae, geteilt. Am Mundhöhlenboden ist sie durch das Zungenbändchen (Frenulum linguae) befestigt. Der Zungenrücken (Dorsum linguae) besitzt eine Vielzahl von Geschmacks- und mechanisch wirksamen Papillen (Papillae linguae) im Epithel. Diese finden sich ebenfalls an der Zungenspitze und an den seitlichen Zungenrändern (NICKEL et al. 1995). Die kegel- oder fadenförmigen Papillae filiformes, welche fast im gesamten Zungenrücken zu finden sind, besitzen eine mechanische Funktion. Beim Hund sind sie eher weich und nehmen rachenwärts an Größe zu. Bei der Katze sind es stark verhornte, rachenwärts gerichtete Hornzähne, die wie eine feine Drahtbürste funktionieren und zur Flüssigkeitsaufnahme, dem ‚Abraspeln‘ von Fleischresten von Knochen und dem Säubern des Haarkleides dienen (NICKEL et al. 1995). Die pilzförmigen Papillae fungiformes sind gleichmäßig über die Oberfläche von Zungenspitze und -rücken verteilt und mit besonders großen Geschmacksknospen ausgestattet. Meist nur wenige Papillae vallatae findet man am Übergang vom Zungenkörper zum Zungengrund. Im ringförmigen Spalt jeder Papilla vallata sind Geschmacksknospen enthalten, die sich in ihrer Anzahl tierartlich unterscheiden. An den Seitenrändern im Bereich des Zungengrundes liegen die Papillae foliata, die beim Hund undeutlich und bei der Katze noch schwächer ausgebildet sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das papillenfreie Epithel der Zungenunterseite der Maus zur Bestrahlung und histologischen Untersuchung genutzt. Dies wird deshalb im Weiteren näher charakterisiert.

2.6.3 Histologie des Epithels der Zungenunterseite der Maus

Die Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus wird von einem mehrschichtigen verhornten Plattenepithel gedeckt. In Abbildung 1 ist der histologische Aufbau dargestellt. Die Submukosa, die der quergestreiften Zungenmuskulatur aufliegt, wird durch die Basalmembran vom Epithel abgegrenzt. Auf der epithelialen Seite der Basalmembran befinden sich

prismatische Zellen, die das Stratum basale (Basalzellschicht) bilden. Daran schließt sich das Stratum spinosum an, bestehend aus polyedrischen, zur Oberfläche hin flacher werdenden Zellen. Diese Schicht wird als Stachelzellschicht bezeichnet, da die Zellen üblicherweise eine große Anzahl von Interzellularbrücken (Desmosomen) besitzen, die den Zellen bei der Schrumpfung im Rahmen der Fixation im mikroskopischen Bild ein „stacheliges“ Aussehen verleihen. Das Stratum basale und die tiefen Anteile des Stratum spinosum werden als Stratum germinativum (Germinativschicht) zusammengefasst, in welchem die gesamte Zellproduktion stattfindet (DÖRR 1987). Die darüber liegende Schicht ist das Stratum granulosum (Granulosazellschicht). Sie stellt die äußerste kernhaltige Schicht dar. Die Granulosazellen sind durch basophile keratohyalinhaltige Granula gekennzeichnet. Es handelt sich um eine Schicht mit wenigen Zelllagen. Als funktionelle Schicht werden die nichtproliferativen Anteile des Stratum spinosum und des Stratum granulosum mit ihren postmitotischen kernhaltigen Zellen bezeichnet (DÖRR 1997a). Hier erfolgen die Differenzierung und die Migration der Zellen zur Epitheloberfläche. Die tiefe Epithelschicht, das Stratum profundum mit kernhaltigen Zellen, besteht somit aus den Zellen der Basal-, Stachelzell- und Granulosazellschicht.

Das Stratum superficiale, bestehend aus kernlosen Zellkörpern, schließt das dünne, azidophile Stratum lucidum und das Stratum corneum ein. Im Stratum lucidum findet die Umwandlung des Keratohyalin in Eleidin statt. Eleidin wird im Stratum corneum in Keratin umgebaut. Die in Keratin umgewandelten Zellen bilden aus mehreren Lagen das Stratum corneum. Die gesamte Schleimhaut, einschließlich der kernlosen Schichten, besitzt bei der Maus (Stamm C3H/Neu) eine Dicke von ca. 100 µm (DÖRR 1997a).

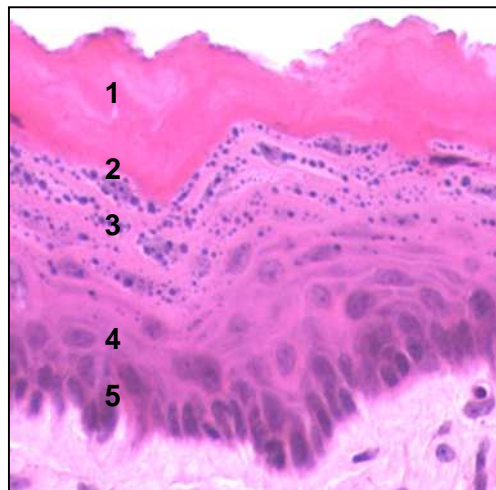


Abb. 1: Histologischer Aufbau des mehrschichtigen verhornenden Plattenepithels der Zungenunterseite der Maus (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

1: Stratum corneum, 2: Stratum lucidum, 3: Stratum granulosum, 4: Stratum spinosum, 5: Stratum basale

2.6.3.1 Proliferative Organisation der Zungenunterseite

Die Schleimhaut der Zungenunterseite gehört zu den Mauser- oder Umsatzgeweben. Charakteristisch ist die permanente Zellneubildung in der germinativen Schicht zum Ausgleich des ständigen Zellverlustes an der Schleimhautoberfläche. Das exakte Gleichgewicht zwischen der Zellproduktion in der Germinativschicht und dem Zellverlust (POTTEN u.

HENDRY 1983) wird durch Epithel-Stammzellen mit unbegrenzter Teilungsfähigkeit aufrechterhalten (DÖRR 1997a, DÖRR 2003b, DÖRR et al. 2005, HERRMANN et al. 2006). Stammzellen teilen sich durchschnittlich in zwei verschiedene Tochterzellen (asymmetrische Teilung): eine neue Stammzelle und eine in den Reifezyklus eintretende Tochterzelle (Transitzelle). Die Transitzelle kann noch eine begrenzte Zahl an Teilungen durchführen. Dadurch kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Zellausbeute pro Stammzellteilung.

In der Mundschleimhaut gibt es keine zellulären Merkmale zur Identifizierung der Stammzellen (DÖRR et al. 2005, HERRMANN et al. 2006). Das Stammzellkonzept definiert demzufolge die Stammzelle als funktionelle Einheit, welche das Epithel nach einer Schädigung restituieren kann. Die Stammzellen bestimmen durch ihre Anzahl und ihre intrinsische Strahlenempfindlichkeit die Gesamtempfindlichkeit eines Gewebes gegenüber Bestrahlung (DÖRR u. HERRMANN 2003).

Für die Maus vom Stamm C3H/Neu liegt die durchschnittliche Zellzyklusdauer in der Germinativschicht bei 3,6 Tagen. Die tägliche Zellproduktion beträgt ca. 85 Zellen/mm Epithellänge, bei einer Gesamtzellzahl von 430 Zellen/mm Epithellänge (DÖRR 1997a).

Für die Schleimhaut des oberen Verdauungstraktes von Nagern wird ein ausgeprägter diurnaler Proliferationsrhythmus der Zellneubildung beschrieben (DÖRR et al. 1994a, DÖRR u. KUMMERMEHR 1991). Bestimmt wird dieser Rhythmus durch den Hell-Dunkel-Rhythmus der Umgebung und die davon abhängige Nahrungsaufnahme. Der Substanzverlust an der Epitheloberfläche bei der Nahrungsaufnahme ist der Stimulus für die Teilungsaktivität der Zellen in der Germinativschicht und somit verantwortlich für die Steuerung der Zellproduktion (DÖRR 1997a). In einer zellkinetischen Studie in C3H/Neu-Mäusen mittels Metaphasen-Arrestmethode (DÖRR 1987, DÖRR u. KUMMERMEHR 1991) kann ein Mitosemaximum um 10.00 Uhr festgestellt werden. Die höchste DNA-Syntheseaktivität findet sich zwischen 2.00 und 4.00 Uhr (DÖRR 1987, DÖRR et al. 1994a).

Bei der Maus vom Stamm C3H/Neu befindet sich täglich eine Kohorte von 27% der Germinativzellen bzw. 20% der Gesamtzellen in aktiver Proliferation. Die G1-Phase dauert dabei durchschnittlich 2-3 Tage (DÖRR et al. 1994a, DÖRR u. KUMMERMEHR 1991).

Zellkinetische Studien von POTTEN et al. (2002) an BDF1-Mäusen zum zirkadianen Proliferationsrhythmus zeigen, dass 20% der Basalzellen zwischen 12.00 und 15.00 Uhr mitotisch aktiv sind. Zwischen 21.00 und 3.00 Uhr findet man dagegen keine Zellen, die sich in Mitose befinden. Insgesamt führen 54% der Zellen pro Tag eine Zellteilung durch. Somit existieren deutliche Unterschiede in der Proliferationsstruktur zwischen verschiedenen Mäusestämmen (POTTEN et al. 2002).

Die Umsatzzeit des Epithels bei dem Stamm C3H/Neu beträgt 5 Tage (DÖRR et al. 1994a, DÖRR et al. 1996, DÖRR u. KUMMERMEHR 1991, DÖRR u. WEBER-FRISCH 1995a, 1995b) und ist damit der Turnover-Zeit beim Menschen vergleichbar (DÖRR et al. 1995). Dagegen beträgt beispielsweise die Umsatzzeit bei B6D2F1-Mäusen – welche von POTTEN et al. (2002) eingesetzt werden – nur 3 Tage (DÖRR et al. 2002d).

KELLETT et al. (1989) kann nachweisen, dass der Grad der hierarchischen Gewebsstruktur, d.h. die Anzahl von Subpopulationen proliferierender Zellen (Transitgenerationen) mit unterschiedlichen Zellzykluszeiten, stark abhängig ist vom Ausmaß der Undulation der Basalmembran. Die Undulationen sind an den Papillen der Zungenoberseite sehr stark ausgeprägt, am Zungenunterseitenepithel dagegen nicht oder kaum nachweisbar. Die gleichblei-

bende Zellzykluszeit weist auf die fehlende proliferative Hierarchie hin, woraus geschlussfolgert wird, dass alle proliferierenden Zellen Stammzellen sind (DÖRR 1997a).

2.6.4 Besonderheiten der humanen Mundschleimhaut

Die Mundschleimhaut des Menschen trägt ebenfalls ein mehrschichtiges Plattenepithel, welches aber nur an mechanisch stark beanspruchten Bereichen der Mundhöhle, wie dem harten Gaumen, ein Stratum corneum ausbildet. Die Zellzahl im Epithel und die absolute Zellproduktion variieren je nach Lokalisation in der Mundhöhle (DÖRR et al. 1995, DÖRR 1997a). In Bereichen mit hoher Zellzahl findet sich auch eine hohe Zellproduktion pro Längeneinheit Epithel. Die Umsatzzeit ist deshalb überall in der Mundhöhle gleich und beträgt ca. 5,7 Tage (DÖRR et al. 2002e), vergleichbar mit dem Epithel der Zungenunterseite der Maus.

Auch ein zirkadianer Proliferationsrhythmus kann im menschlichen Mundhöhlenepithel nachgewiesen werden. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen ein Maximum an Zellen in der späten G1-Phase gegen 11.00 Uhr. Cyclin-E exprimierende Zellen, die am Übergang der G1- zur S-Phase vorkommen, findet man am häufigsten gegen 15.00 Uhr. Die für die G2-Phase typischen Cyclin-A positiven Zellen sind gegen 16.00 Uhr zu finden. Somit liegt der Zeitpunkt der maximalen S-Phasenaktivität in dieser Studie zwischen 11.00 und 16.00 Uhr. Die maximale Mitoserate kann gegen 21.00 Uhr nachgewiesen werden (BJARNASON et al. 1999). In einer anderen Untersuchung wird durch Thymidinmarkierung ebenfalls ein 24-Stunden-Rhythmus der DNA-synthetisierenden Zellen nachgewiesen (WARNAKULASURIYA u. MACDONALD 1993). Das Maximum der DNA-Synthese findet sich hier jedoch gegen 22.00 Uhr und stimmt somit nicht mit der vorher erwähnten Studie überein. Ursachen könnten die verschiedenen Techniken zur Zellzyklusbestimmung sein, oder auch interindividuelle Unterschiede im Zeitverlauf des Zellzyklus durch ein unterschiedliches Schlafverhalten der Probanden (BJARNASON et al. 1999).

2.7 Prophylaxe und Behandlung der Mucositis enoralis

Es gibt eine Vielzahl prophylaktischer und therapeutischer Maßnahmen zur Verminderung früher radiogener Reaktionen der Mundschleimhaut. Bisher konnte jedoch kein anerkanntes Konzept in der klinischen Routine etabliert werden (DÖRR et al. 2007, DÖRR et al. 2005, DÖRR et al. 2008, RUBENSTEIN et al. 2004).

Zur periradiotherapeutischen Betreuung von Patienten mit Tumoren der Mundhöhle ist eine Stellungnahme durch die Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK), die Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) und die Deutsche Gesellschaft für Zahnerhaltung (DGZ) erarbeitet worden (GRÖTZ et al. 2002, 2003). Zudem finden sich Anleitungen zur Betreuung dieser Patienten in den Leitlinien zu supportiven Maßnahmen in der Radioonkologie der DEGRO (FEYER et al. 2006). Weitere Leitlinien zur Prophylaxe und Therapie der Haut- und Schleimhautreaktionen werden vom Arbeitskreis Supportive Maßnahmen in der Onkologie (ASO) 2007 veröffentlicht (HARTMANN et al. 2007, HARTMANN et al. 2008). Für weitere, spezielle Maßnahmen zur Prophylaxe und Therapie der enoralen Mukositis sei auf aktuelle Arbeiten wie DÖRR et al. (2007, 2008), EPSTEIN u. KLASSER (2006), KEEFE et al. (2007), NAPENAS et al. (2007), SCIUBBA u.

GOLDENBERG (2006) und STOKMAN et al. (2006) verwiesen. Im Folgenden werden die allgemeinen Grundsätze kurz zusammengefasst.

Allgemeine Maßnahmen

Vor Beginn der Therapie muss der Patient im Aufklärungsgespräch motiviert werden, den Konsum von Alkohol und Nikotin sowie von heißen und scharfen Speisen einzuschränken (FEYER et al. 2006, HARTMANN et al. 2007, HERRMANN et al. 2002). Eine wichtige Rolle spielt auch die wiederholte Anleitung zur Zahn- und Mundhygiene (DÖRR et al. 2008). Im Rahmen der Beratung hat es sich bewährt, dem Patienten schriftliche Merkhilfen, z.B. zur Mundpflege (HERRMANN et al. 2002) oder zur Xerostomie (DÖRR et al. 2004a) zur Verfügung zu stellen, um die Inhalte langfristig verfügbar zu machen.

Zur Infektionsprophylaxe sollte vor Beginn der Therapie eine gründliche Sanierung der Zähne und anderer pathologischer Mundhöhlenbefunde erfolgen (GRÖTZ et al. 2002, 2003). Es sollte auf eine optimale Reduktion des Bestrahlungsfeldes geachtet werden. Dentale Metall-Legierungen führen bei Strahlenapplikation zu einer Dosiserhöhung an der anliegenden Schleimhaut durch Sekundärstrahlung um bis zu 170% (DÖRR et al. 2007, DÖRR et al. 2008). Der Einsatz von Schleimhautretraktoren (Abstandhalter) kann die angrenzende Mukosa schützen. Prothesen sollten während der Bestrahlungszeit und darüber hinaus nicht getragen werden, um Druckstellen an der Schleimhaut zu vermeiden.

Die persönliche Betreuung durch den Radioonkologen und das Pflegepersonal kann zu einer deutlichen Reduktion an schmerzstillenden Medikamenten führen (DÖRR et al. 2008).

Mundspülungen

Mundspülungen auf Kamillenbasis (Kamillosan®) unter Radiochemotherapie haben einen antiinflammatorischen, antimikrobiellen und spasmolytischen Effekt. Jedoch kann eine vorhandene Xerostomie verstärkt werden, weshalb Kamille nicht zu empfehlen ist. Als Alternative gilt die Verwendung von verdünntem Salbeisud (DÖRR 1997a, DÖRR et al. 2004a, 2007, 2008). Spülungen mit Wasser und physiologischer Kochsalzlösung sind den industriell gefertigten Spülungen wie Bepanthen oder Polyvidon-Jod nicht unterlegen. Zusammengefasst gilt, dass die zur Spülung verwendeten Inhaltsstoffe per se keinen ausgeprägten Effekt auf Verlauf und Schweregrad der enoralen Mukositis haben. Wichtig sind dagegen die Häufigkeit, Regelmäßigkeit und Intensität der Spülungen (DÖRR et al. 2005, 2005b, 2008).

Schmerzbehandlung

Strahlenfolgen in der Mundhöhle gehen bereits früh mit Schmerzen einher. Um die Konsequenzen für den Patienten, wie mangelnde Therapiecompliance, verminderte Nahrungsaufnahme etc. zu minimieren, ist deshalb eine effiziente Schmerztherapie, lokal und gegebenenfalls auch systemisch, essentiell (DÖRR et al. 2007, 2008).

Antibiose

Zur Behandlung der relativ häufig auftretenden *Candida albicans* Infektion (Soorstomatitis) hat sich die Gabe von Amphotericin B oder Nystatin als Lutschtablette oder Suspension bewährt (GRÖTZ et al. 2003). Fluconazol steht alternativ zur oralen oder systemischen Behandlung zur Verfügung (DÖRR et al. 1997, DÖRR et al. 2008, NICOLATOU-GALITIS et al.

2006). Die Kombination von Polymyxin B, Tobramycin und Amphotericin B eignen sich zur selektiven Antibiose gegen die typischen, opportunistischen, gramnegativen Bakterien und Pilze (VERDI 1993). Erst nach einer Bestimmung des Keim- und Resistenzspektrums, die während der Therapie regelmäßig überprüft werden muss, sollte eine gezielte Antibiose stattfinden (DÖRR et al. 1997, DÖRR et al. 2007).

Entzündungshemmung

Grundsätzlich können als entzündungshemmende Substanzen Steroide oder nichtsteroidale Antiphlogistika eingesetzt werden. Zur Verwendung von Steroiden, die nicht nur die Prostaglandinsynthese hemmen, sondern noch andere Entzündungsmechanismen beeinflussen (Einfluss auf Kohlehydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel), gibt es widersprüchliche Aussagen. Aufgrund der Abhängigkeit der Steroidwirkung vom Schadensniveau und in Anbetracht der Nebenwirkungen kann der routinemäßige Einsatz in der Strahlentherapie nicht empfohlen werden (WILKOWSKI u. ZIMMERMANN 2001, FEYER et al. 2006, HARTMANN et al. 2008).

Zu den getesteten nichtsteroidalen Medikamenten gehört Benzydamin mit analgetischen, anästhetischen, antiinflammatorischen und antiseptischen Eigenschaften. In verschiedenen Studien kann eine Reduktion der Entzündungsreaktion und des Mukositisgrades festgestellt werden (DÖRR et al. 2007). Die Anwendung von Benzydamin-Mundspüllösungen ist durchaus empfehlenswert (DÖRR et al. 1997), wobei jedoch die Compliance der Patienten wegen des unangenehmen Geschmacks eingeschränkt ist.

Biologische Konditionierung

Bei der Kryotherapie wird Kälte durch Lutschen von Eistabletten appliziert, wobei Wasser oder auch Salbeisud verwendet werden können. Es ist darauf zu achten, dass die Eiswürfel nicht zu kalt oder scharfkantig sind. Die lokale Kühlung vor der Bestrahlung führt über eine Vasokonstriktion zu einer temporären lokalen Hypoxie (DÖRR et al. 1997, 2007, 2008). Anoxische Zellen sind deutlich strahlenresistenter als euoxische Zellen (Sauerstoffeffekt). Unter Strahlentherapie kann deshalb eine schleimhautschützende Wirkung beobachtet werden. Die Gefahr besteht in einer gleichsinnigen Beeinflussung oberflächlicher Tumoren. Eine vergleichbare Wirkung entfalten Lokalanästhetika (DÖRR et al. 2007, 2008).

Ein weiterer Ansatz der biologischen Konditionierung ist die Stimulation der Proliferation in der Schleimhaut bereits vor der Strahlentherapie. Dabei sollen Regenerationsprozesse (Repopulierung, siehe Kap. 2.8.3) gefördert werden (DÖRR et al. 1997). Der normale Proliferationsreiz im Schleimhautepithel besteht in der Ablation funktioneller Gewebsschichten im Rahmen mechanischer und chemischer Beanspruchung der Oberfläche, z.B. bei der Nahrungsaufnahme. Zur biologischen Konditionierung steht die chemische Ablation mittels milder Adstringenzen, wie z.B. Silbernitratlösung, zur Verfügung. Im Tiermodell kann eine deutliche Steigerung der Proliferation und damit auch eine signifikante Erhöhung der Toleranz gegenüber fraktionierter Bestrahlung erzielt werden. Diese funktionelle Wirkung ist eindeutig abhängig von der Dosisintensität, d.h. von der wöchentlichen Dosis (DÖRR u. KUMMERMEHR 1992). Auch beim Menschen kann histologisch eine vergleichbare Steigerung der Zellproduktion durch eine Silbernitratbehandlung nachgewiesen werden (DÖRR et al. 1995). Der schleimhautprotektive Effekt der Silbernitrat-Vorbehandlung besteht jedoch

nur unter akzelerierter Strahlentherapie (MACIEJEWSKI et al. 1991), nicht unter konventionell fraktionierter Bestrahlung (DÖRR et al. 1995).

Eine weitere Möglichkeit ist die Ablation oberflächlicher Schleimhautschichten mittels Laserbehandlung (DÖRR et al. 2007, GENOT u. KLASTERSKY 2005). Ein schleimhautprotektiver Effekt wird nachgewiesen. Die Methode ist aber technisch sehr aufwendig und abhängig von der Erfahrung des Behandlers, so dass eine allgemeine Empfehlung derzeit nicht ausgesprochen werden kann (FEYER et al. 2006).

Wachstumsfaktoren

Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ist der Einsatz von Wachstumsfaktoren. Voraussetzung für den Einsatz ist die selektive Wirkung. Vor dem klinischen Einsatz muss deshalb abgeklärt werden, dass keine Stimulierung der Tumorproliferation vorliegt.

Viel versprechend zur Prophylaxe und Therapie der oralen Mukositis sind die zahlreichen Untersuchungen zum Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF), die in Kapitel 2.10 ausführlich dargestellt sind. Zur Therapie der radiogenen oralen Mukositis steht die rekombinante humane Form von KGF (rHuKGF, Palifermin) zur Verfügung. Im Rahmen der konditionierenden Behandlung vor Stammzelltransplantationen wird auf der Basis großer kontrollierter Studien (SPIELBERGER et al. 2004) die Gabe von Palifermin empfohlen (VON BÜLTZINGSLÖWEN et al. 2006). Für die Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren sind die Resultate erster klinischer (BRIZEL et al. 2001) sowie einer Vielzahl präklinischer Untersuchungen (DÖRR 2003a, DÖRR et al. 2005a, DÖRR et al. 2007, DÖRR et al. 2002a, DÖRR et al. 2008) viel versprechend. Die positiven Ergebnisse einer randomisierten, placebo-kontrollierten Phase III-Studie liegen als Kongressbeitrag vor (HENKE et al. 2008).

Sonstige

Der Radikalfänger Amifostin (WR2721) zeigt in Tierexperimenten ebenfalls eine Reduktion der Mukositis, in starker Abhängigkeit vom Behandlungsprotokoll. Erfolgt die systemische Behandlung mit Amifostin zu Beginn einer fraktionierten Bestrahlung, stellt sich ein mukoprotektiver Effekt ein. Zu einem späteren Zeitpunkt der Bestrahlung bleibt die Amifostin-Gabe wirkungslos bzw. maskiert sogar den Effekt der frühen Applikation (FLEISCHER u. DÖRR 2006). Der Wirkmechanismus bleibt ungeklärt. Klinische Daten zum Einsatz von Amifostin sind widersprüchlich (DÖRR et al. 2008). Für die Speicheldrüsen wird in mehreren klinischen Studien eine schützende Wirkung nachgewiesen (BÜNTZEL et al. 1999, RUDAT et al. 2000, TROTTI et al. 2003). Zu den Nebenwirkungen von Amifostin zählen schwerste Übelkeit mit Erbrechen, Krämpfe, Senkung des systolischen Blutdruckes, Schüttelfrost und Bewusstseinsstrübung. Die Anwendung sollte deshalb nur innerhalb von Studien erfolgen.

Eine neuere Untersuchung beschäftigt sich mit der mukoprotektiven Wirkung von Selen im Tiermodell (GEHRISCH u. DÖRR 2007). Die Applikation von Natriumselenit erfolgt topisch oder subkutan unter Einzeit- und fraktionierter Bestrahlung. Die Strahlentoleranz nimmt gegenüber täglich fraktionierter Bestrahlung bei Gabe in der ersten Woche signifikant zu. In der zweiten Woche kann jedoch kein signifikanter Effekt mehr gefunden werden.

Aktuelle Studien beschäftigen sich mit der mukoprotektiven Wirkung einer Therapie mit adulten Stammzellen (DÖRR et al. 2005c). Durch die Transplantation von Knochenmark

oder die Mobilisierung körpereigener Stammzellen aus dem Knochenmark mittels des Wachstumsfaktors G-CSF kann bei fraktionierter Bestrahlung eine deutliche Schleimhautschonung erreicht werden (KUSCHEL et al. 2006).

2.8 Einflussfaktoren der Strahlenempfindlichkeit

Der Effekt einer Radiotherapie auf Normalgewebe und Tumoren wird durch vier Parameter charakterisiert. WITHERS (1975) bezeichnet sie als die „4 R der Radiotherapie“. Dazu gehören:

1. Erholungsvorgänge subletaler Strahlenschäden (Recovery)
2. Repopulierung/Regeneration der Zellen während der Gesamtbehandlungszeit
3. Redistribution der Zellen innerhalb des Zellzyklus und
4. Reoxygenierung.

Ein weiterer Effekt ist die intrinsische Strahlenempfindlichkeit der Gewebe, die als fünftes „R“ (Radiosensitivität) eingeführt wird (STEEL 2002).

2.8.1 Intrinsische Strahlenempfindlichkeit

Stammzellkonzept

Die intrinsische Strahlenempfindlichkeit ist die genetisch determinierte Empfindlichkeit von Zellen bzw. Geweben gegenüber ionisierender Bestrahlung (DÖRR 1997a, HERRMANN et al. 2006). Stammzellen in Normalgeweben stellen im strahlenbiologischen Sinn diejenigen Zellen dar, die nach einer Strahlenexposition die Zellpopulation und damit die Gewebestruktur wiederherstellen können. Dieses Konzept definiert die Stammzelle als funktionelle Einheit. Stammzellen sind durch ihre Anzahl und ihre intrinsische Strahlenempfindlichkeit verantwortlich für die Strahlentoleranz eines Gewebes. Nach diesem Konzept besteht auch die Möglichkeit, dass bei Bedarf Stammzellen aus frühen Stadien der Differenzierung rekrutiert werden können (DÖRR 1997a). Dagegen haben andere Zellen, wie proliferierende Transit- oder differenzierte Zellen keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit. Eine direkte Identifikation der Stammzelle nach strukturellen und morphologischen Eigenschaften ist derzeit – zumindest in Epithelien – nicht möglich.

Klonogenes Zellüberleben

Ein Kriterium für das Überleben einer Stammzelle ist die Produktion einer unbegrenzten Nachkommenschaft, d.h. ihre „Klonogenität“. Klonogene Zellen sind bei in-vitro Untersuchungen (Koloniebildungstest) üblicherweise als diejenigen Zellen definiert, die befähigt sind, Kolonien mit mehr als 50 Tochterzellen zu bilden.

Die Dosisabhängigkeit des Zellüberlebens kann durch eine linear-quadratische Funktion (Überlebensrate $sf = \exp[-(\alpha d + \beta d^2)]$) beschrieben werden. Für die Einzeitbestrahlung resultiert die halblogarithmische graphische Darstellung in einer typischen Schulterkurve (DÖRR et al. 2005d).

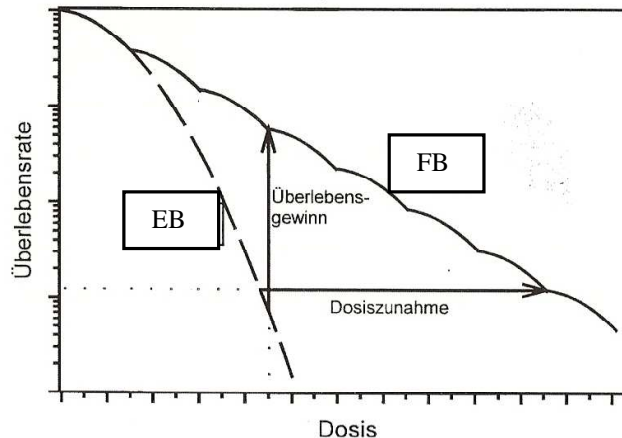


Abb. 2: Klonogenes Zellüberleben. Diagramm modifiziert nach DÖRR et al. (2005d)

EB zeigt eine typische Schulterkurve nach Einzelbestrahlung. FB stellt die Überlebenskurve nach fraktionierter Bestrahlung dar.

Die Überlebensrate (surviving fraction, SF) der Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy, als ein Maß für die intrinsische Strahlenempfindlichkeit, wird als SF2 bezeichnet. Die SF2-Werte variieren für unterschiedliche Zellarten erheblich (HERRMANN et al. 2006). Ebenso dient die D_0 (mittlere Überlebensdosis, d.h. die Dosis, die im exponentiellen Teil einer Zellüberlebenskurve eine Überlebensrate von 37% bewirkt) zur Charakterisierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit.

Solche Untersuchungen können an Zelllinien, aber auch an primären Zellen nach Zellvereinzelung aus Organen oder Tumoren durchgeführt werden. Die Festigkeit der interzellularen Kontakte der oralen Schleimhaut bedingt jedoch, dass die Zellvereinzelung nur durch sehr aggressive Techniken möglich ist (DÖRR et al. 1994a). Möglicherweise kommt es dadurch zu einer Selektion der gewonnenen Zellen.

Nach DÖRR (1997a) können durchschnittliche Werte von $\alpha=0,2 \text{ Gy}^{-1}$ und $\beta=0,02 \text{ Gy}^{-2}$ als repräsentativ zur Beschreibung der Strahlenempfindlichkeit von Keratinozyten angenommen werden. Die durchschnittliche Überlebensrate bei 2 bzw. 3 Gy beträgt somit 62 bzw. 46%.

2.8.2 Erholungskapazität (Recovery)

Erholungsvorgänge bezeichnen die Fähigkeit von Zellen und Geweben, während fraktionierter Bestrahlung einen Teil der applizierten Dosis zu kompensieren. Grundlage ist, dass Bestrahlung zwei Arten von Schäden verursacht: primär zytoletale Schäden und sogenannte subletale Schäden, die erst bei räumlicher und zeitlicher Interaktion miteinander zum Zelltod führen. Letztere können durch Erholungsprozesse zwischen den Fraktionen beseitigt werden und stehen dann bei der nächsten Fraktion für Interaktionen nicht mehr zur Verfügung. Durch den Fraktionierungseffekt erhöht sich somit die Gesamtdosis, die zum Erreichen einer bestimmten Abtötungsrate nötig ist. Der Überlebensgewinn ist dabei abhängig vom betrachteten Effekt (Überlebensrate) sowie von der zellartspezifischen Form der Überlebenskurve als Ausdruck der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit. Zu den Einflussfaktoren gehören weiterhin Strahlenart, Dosis pro Fraktion und das Zeitintervall zwischen den Fraktionen.

Zur mathematischen Beschreibung des Fraktionierungseffektes dient das von THAMES u. HENDRY (1987) beschriebene Linear-Quadratische Modell (LQ-Modell) des Zellüberlebens in-vitro in Abhängigkeit von der Dosis (Formel siehe Kap. 2.8.1.2.). Der direkte zytoletale Schaden (α -Schaden) steht in linearer Abhängigkeit von der Dosis d. Die Wahrscheinlichkeit jedes einzelnen subletalen Schadens (β -Schaden) ist linear dosisabhängig, deshalb ist die Wahrscheinlichkeit der zytoletalen Wirkung über Interaktion abhängig vom Quadrat der Dosis.

In-vivo ist der Fraktionierungseffekt durch eine Verschiebung der Dosis-Effekt-Kurve zu höheren Dosen gekennzeichnet, entsprechend dem Anstieg der Dosis, die zum Erreichen eines bestimmten Effekts nötig ist. Hier erfolgt die Quantifizierung über den (gewebs- und Endpunkt-spezifischen) α/β -Wert, mit der Einheit Gy. Sind die Werte für α/β hoch, entspricht dies einem kleinen Fraktionierungseffekt. Mit durchschnittlich 10 Gy ist der α/β -Wert der Mundschleimhaut relativ hoch (DÖRR et al. 2007, HERRMANN et al. 2006), der Fraktionierungseffekt somit gering, aber dennoch signifikant nachweisbar (DÖRR et al. 1993, PABST et al. 2004). Erholungsvorgänge beeinflussen somit die Strahlenempfindlichkeit der Mundschleimhaut, sind aber von untergeordneter Bedeutung.

Die Erholung folgt einer exponentiellen Kinetik und kann deshalb durch eine Halbwertszeit beschrieben werden. Üblicherweise liegt die Halbwertszeit für Zellen in-vitro bei ca. 1 h. Für die Mundschleimhaut der Maus liegt sie im Bereich von 45–60 min. Beim Menschen werden signifikant längere Halbwertszeiten geschätzt (BENTZEN et al. 1996). Während somit der α/β -Wert, d.h. die Erholungskapazität vom Tierexperiment auf die Klinik übertragbar ist, gilt dies für die Halbwertszeiten, d.h. die Erholungskinetik nicht. Als Richtwert für die Praxis gilt, dass die Erholung bei kurzen Intervallen unter 4–6 h unvollständig ist und der Bestrahlungseffekt deshalb höher als auf der Basis vollständiger Erholung erwartet.

2.8.3 Repopulierung

Umsatzgewebe und Tumoren reagieren auf eine fraktionierte, zeitlich ausgedehnte Strahlentherapie mit Regenerationsprozessen (Repopulierung); dieses Phänomen wird als Zeitfaktor bezeichnet. Die Repopulierung ist ein wesentlicher Faktor der Strahlentoleranz an der Mundschleimhaut. Sie schließt eine Beschleunigung der Stammzellteilungen (Akzeleration), die Bildung von zwei Tochterstammzellen pro Stammzellteilung (symmetrische Stammzellteilungen, Asymmetrieverlust) und auch eine begrenzte Teilungsaktivität letal bestrahlter Zellen (abortive Teilungen) ein (DÖRR 1997b, 2003b). Als Auslöser werden die allgemeine Zellzahlverminderung im Gewebe einerseits und die strahlenbedingte Abnahme der Stammzellzahl andererseits angenommen.

Durch diese Repopulierungsvorgänge kommt es, zusätzlich zum Fraktionierungseffekt, zu einer weiteren Erhöhung der isoeffektiven Dosen, wenn die Gesamtbehandlungszeit verlängert wird. Die Repopulierungsvorgänge zeigen einen komplexen, nichtlinearen zeitlichen Verlauf mit einer initialen Verzögerung, deren Länge dosisabhängig ist. Eine Verlängerung der Gesamtbehandlungszeit oder das Einschieben einer Bestrahlungspause bietet eine zusätzliche Möglichkeit zur Repopulierung und führt damit zu einer Reduktion von Frühnebenwirkungen. Gleiches gilt jedoch auch für die Tumorheilungswahrscheinlichkeit, da Tumoren ebenfalls ausgeprägte Repopulierung zeigen können. Die Rate an Nebenwirkungen in spät reagierenden Geweben bleibt hingegen unverändert (Ausnahme: konsekutive Späteffekte).

Zeitfaktor und Fraktionierungseffekt sind voneinander vollkommen unabhängig und müssen getrennt betrachtet werden (DÖRR 1997a, DÖRR 1997b, DÖRR et al. 2005, DÖRR 2003b, HERRMANN et al. 2006).

Die Repopulierungsleistung der Schleimhaut der Maus ist umso effektiver, je höher die Dosis während der ersten Behandlungswoche(n) ist (DÖRR 2003b). Die Analyse klinischer Daten beschreibt ebenfalls eine Steigerung der Repopulierungsleistung in Abhängigkeit von der Dosisintensität (BENTZEN 2003). Bei der akzelerierten Hyperfraktionierung (CHART-Protokoll) zeigt sich eine gegenüber der Erwartung signifikant geringe Ausbildung von Strahleneffekten an der Mundschleimhaut.

2.8.4 Reoxygenierung

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ist abhängig von der Sauerstoffkonzentration in den Zellen. Gut mit Sauerstoff versorgte Zellen sind um bis zu einem Faktor drei strahlenempfindlicher als anoxische Zellen (HERRMANN et al. 2006). Im Tumorgewebe gibt es eine signifikante Fraktion hypoxischer Zellen. Unter Reoxygenierung versteht man die Verbesserung der mangelnden Sauerstoffversorgung der Tumorzellen während der Bestrahlung (STEEL 2002). Für die Strahlenreaktion von Normalgeweben haben Reoxygenierungsprozesse jedoch keine Bedeutung, da hier keine oder nur eine geringe und konstante Fraktion hypoxischer Zellen vorliegt.

2.8.5 Redistribution

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit schwankt zwischen den Zellzyklusphasen (HERRMANN et al. 2006). Die Sensitivität ist in der G2- und der Mitosephase am höchsten, am geringsten in der späten G1- und der S-Phase (HERRMANN et al. 2006). Durch eine Bestrahlung werden hauptsächlich Zellen in den radiosensitiven Zellzyklusphasen abgetötet. Es bleibt ein relativ erhöhter Anteil von resistenten Zellen übrig. Eine reversible Blockade der überlebenden Zellen am Übergang der G2- zur Mitosephase („G2- oder Mitoseblock“) führt zur Synchronisation des nächsten Zellzyklus nach der Bestrahlung. Das Zurückverteilen dieser Zellen in die verschiedenen Zellzyklusphasen, aufgrund von (geringen) Unterschieden in der Zellzyklusdauer, bezeichnet man als Redistribution (WITHERS 1972).

Der Einfluss von Zellzykluseffekten auf die Strahlenempfindlichkeit der Mundschleimhaut bei einer fraktionierten Strahlentherapie ist aufgrund von strahlenbiologischen Untersuchungen nicht auszuschließen (DÖRR et al. 1993). Da sie aber experimentell nur schwer zu erfassen sind, liegen keine quantitativen Daten vor.

2.9 Tiermodelle zur Untersuchung der radiogenen Mucositis enoralis

Zur Untersuchung der radiogenen enoralen Mukositis wurden schon seit Mitte des vorigen Jahrhunderts verschiedene Tiermodelle etabliert. Die ersten Untersuchungen zur Strahlenreaktion an Plattenepithelien finden an der Haut von Mäusen, Ratten und Schweinen statt. Da sich aber Haut und Mundschleimhaut in wesentlichen Punkten bezüglich Anatomie, Physiologie und proliferativen Eigenschaften unterscheiden, sind die Ergebnisse nur eingeschränkt übertragbar.

Erstmals weisen GOEPP u. FITCH (1962) die Bedeutung der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut bei Mäusen nach. Folgen einer Kopfbestrahlung sind frühe Strahlenveränderun-

gen an der Schleimhaut mit daraus resultierender Beeinträchtigung der Futteraufnahme, die ursächlich für die letale Wirkung der Bestrahlung sind. Histologische Untersuchungen von QUASTLER et al. (1956) bestätigen die strahleninduzierten Veränderungen. Heute wird als Tiermodell zur Untersuchung der strahleninduzierten Mukositis die orale Schleimhaut verschiedener Labornager angewendet.

Schleimhaut der Hamster-Backentasche

Die Hamsterbackentasche als Modell der Mucositis enoralis etablieren SONIS et al. (1990) für Untersuchungen zu chemotherapie-assoziierten Nebenwirkungen. Durch die Größe der Backentasche steht ein großes Schleimhautareal für die Untersuchung zur Verfügung. Zum Auslösen einer klinischen Mukositis ist es jedoch notwendig, die Schleimhaut mechanisch, z.B. mit einem scharfen Löffel, zu irritieren. Dies scheint schwer zu standardisieren. Zur Strahlenwirkung, speziell bei fraktionierten Protokollen, gibt es bisher nur wenige Untersuchungen, z.B. ARA et al. (2008).

Zungenschleimhaut der Ratte

Die Schleimhaut der Zungenunterseite der Ratte wird von DÖRR (1987) erstmals als Tiermodell für strahlenbiologische Untersuchungen beschrieben. REZVANI u. ROSS (2003) benutzen in ihren Versuchen ebenfalls die Zungenunterseite von Ratten. Es wird ein lokal begrenztes Feld der Zungenunterseite bestrahlt. Als klinischer Endpunkt wird die Ulzeration der Schleimhaut definiert. Die Ratten zeigen bei höheren Dosen deutliche Auswirkungen auf das Allgemeinbefinden mit einem Gewichtsverlust bis zu 30% (DÖRR 1987). Untersuchungen mit fraktionierter Bestrahlung mit diesem Modell sind bisher nicht veröffentlicht worden.

Schleimhaut der Mäuselippe

Die Mäuselippe ist als spezifisches Modell für strahlenbiologische Untersuchungen an der Mundschleimhaut eingeführt worden (ANG et al. 1985, PARKINS et al. 1983). Analysiert werden lokale Veränderungen wie Erythem und denudative Läsionen als klinischer Endpunkt. Aufgrund der Anatomie der Lippe, die einen Haut-Schleimhaut-Übergang darstellt, lassen sich die gewonnenen Ergebnisse jedoch nur beschränkt auf die alleinige Schleimhautreaktion übertragen. Bei den Untersuchungen an der Mäuselippe wird die gesamte Schnauze bis zur Auslösung klinischer Symptome bestrahlt. Durch die frühen Strahlenreaktionen kommt es zur Beeinträchtigung der Nahrungsaufnahme, die zu einem massiven Gewichtsverlust von bis zu 40% führt. Somit kann eine Beeinflussung der Schleimhautreaktion durch die Mangelernährung nicht ausgeschlossen werden.

Zungenschleimhaut der Maus

Die Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus als Tiermodell wird erstmals durch MOSES u. KUMMERMEHR (1986) beschrieben. Diese Schleimhaut besitzt – wie auch die Schleimhaut der Mäuselippe und der Rattenzunge – ein verhornendes Plattenepithel. Die humane Schleimhaut besteht dagegen hauptsächlich aus unverhorntem Plattenepithel und ist nur an mechanisch stark beanspruchten Regionen verhornt. Die Strahlenreaktion findet jedoch in den proliferativen Anteilen der Schleimhaut statt und nicht im enddifferenzierten Kompartiment. Auch die zellkinetischen Parameter stimmen im Wesentlichen überein (DÖRR et al.

1994b), so dass sich die Mundschleimhaut der Zungenunterseite der Maus gut für strahlenbiologische Untersuchungen zur Mucositis enoralis eignet.

Der Nachteil der Bestrahlung der gesamten Zungenunterseite ist die Beeinträchtigung der Futteraufnahme. Auch die wiederholte Manipulation an der Zunge bei fraktionierter Bestrahlung könnte die Ergebnisse verfälschen. Deshalb modifiziert DÖRR (1987) das Modell, indem er die Bestrahlung und somit die klinische Reaktion auf ein 3x3 mm² großes Feld begrenzt. Die fraktionierte Bestrahlung findet als externe Schnauzenbestrahlung statt, bei der die Narkose der Tiere entfällt. Die externe Schnauzenbestrahlung wiederum wird nur bis zu einem subklinischen Schadensniveau durchgeführt, um Strahleneffekte im gesamten Gebiet der Schnauze zu vermeiden. Abschließend erfolgt eine Testbestrahlung („Top-up“) des Testfeldes auf der Zungenunterseite mit gestaffelten Dosen, durch die der subklinische Schaden mit dosisabhängiger Inzidenz in eine klinisch manifeste Ulzeration überführt wird. So kann die Resttoleranz des Gewebes bzw. das Ausmaß des subklinischen Schadens durch die fraktionierte Bestrahlung quantifiziert werden. Durch die Begrenzung der Reaktion auf das Testfeld kann der Gewichtsverlust der Tiere vollständig vermieden werden (DÖRR et al. 1993, DÖRR u. KUMMERMEHR 1990).

2.10 Epidermaler Wachstumsfaktor – EGF

2.10.1 Struktur und physiologische Funktion

COHEN beschreibt 1962 ein aus der Unterkieferspeicheldrüse von männlichen Mäusen isoliertes Protein, welches das frühe Öffnen der Augenlider und die Dentition reguliert. Aufgrund der Beteiligung an Reife- und Wachstumsprozessen in der Epidermis wird der Faktor als epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) bezeichnet. EGF ist damit einer der ersten in der Literatur beschriebenen Wachstumsfaktoren.

EGF ist ein einzelkettiges saures Polypeptid, bestehend aus 53 Aminosäuren mit drei intramolekularen Disulfidbrücken, die für eine stabile tertiäre Struktur nötig sind. Die Disulfidbrücken sind charakteristisch für EGF und verwandte Peptide (TGF- α) sowie wichtig für die biologische Aktivität (BONNSTRA et al. 1995). Das Peptid ist nicht glykosiliert und sehr stabil.

2.10.2 EGF-Rezeptor

Normalgewebe

In der Epidermis wird der EGFR hauptsächlich in der proliferativen Zellschicht exprimiert (CHEN et al. 1995, NANNY et al. 1984). Der EGFR ist ein transmembranes Glycoprotein mit etwa 170 kD. An der externen Domäne befinden sich zwei cystein-reiche Domänen, zwischen denen die EGF-bindende Domäne lokalisiert ist. Eine Wasser abweisende Domäne des EGFR überbrückt die Membran. An der internen Domäne des Rezeptors befindet sich eine Region mit etwa 300 Aminosäuren, die wie die katalytische Domäne einer Proteinkinase aufgebaut ist. Deshalb gehört der EGFR zur Klasse der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Die C-terminale Domäne besitzt bestimmte regulatorische Funktionen. Sie beinhaltet auch eine Anzahl von Tyrosinresten, die der Rezeptor selbst phosphorylieren kann (BOONSTRA et al. 1995). Die autophosphorylierten Tyrosinreste sind an der Rezeptor-Substrat-Bindung beteiligt (BOONSTRA et al. 1995).

Zur EGFR-Gen-Familie gehören neben EGFR (c-erbB-1) noch ERB2 (c-erbB-2, HER2, herregulin), ERB3 (c-erbB-3, HER3) und ERB4 (HER4) (PLOWMAN 1993).

Tumorgewebe

EGFR ist in einer Reihe solider Tumoren überexprimiert und geht mit einer höheren Strahlenresistenz von Tumoren (MILAS et al. 2004) und einer schlechteren Prognose nach einer Strahlentherapie einher (Übersichten in BAUMANN u. KRAUSE (2004), MENDELSON u. BASELGA (2003)). Eine hohe EGFR-Expression bei primären Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich ist ebenfalls mit einem signifikant verminderten krankheitsfreien Intervall und verringerter Überlebensdauer verbunden (CHUNG et al. 2006, GRANDIS et al. 1998, TEMAM et al. 2007). Eine Überexpression der verschiedenen EGFR (PLOWMAN et al. 1993, BOONSTRA et al. 1995) findet man für aggressive Tumoren der Brust, Blase, Lunge und Magen (PRIGENT u. LEMOINE 1992, WIKSTRAND u. BIGNER 1998). Hohe Konzentrationen HER2 werden in Brust- und Ovarialkarzinomen mit schlechter klinischer Prognose exprimiert (SLAMON et al. 1987). HER3 findet man in einer Anzahl von humanen Adenokarzinomen (KRAUS et al. 1989). HER4 wird hauptsächlich in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien, aber auch in normalem Skelettmuskel, Herz und einigen Gehirnteilen gebildet (PLOWMAN et al. 1993).

EGF-Rezeptor-Aktivierung

Die Aktivierung des Rezeptors über seine natürlichen Liganden (EGF, TGF- α), oder ligandenunabhängig, zum Beispiel durch Bestrahlung, führt nach einer Dimerisierung zweier EGFR-Moleküle oder eines EGFR-Moleküls und eines weiteren Mitgliebes der ErbB-Rezeptorfamilie zur Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden. Dadurch können neben der Proliferation der Zelle u.a. auch das Zellüberleben und die Angiogenese gefördert werden (Übersichten in HERBST (2004), MARMOR et al. (2004)). Neuere Daten sprechen für einen Zusammenhang zwischen der EGFR Signaltransduktion und DNA-Reparaturprozessen (DITTMANN et al. 2005, TOULANY et al. 2006).

Nach der Aktivierung kommt es zu einer Translokation des Rezeptors von der Membran in den Zellkern. Dort führt EGFR zu einer Stimulation der DNA-Reparatur und zu einer Erhöhung des Zellüberlebens (DITTMANN et al. 2007).

2.10.3 Möglichkeiten und Potential der EGFR-Inhibition

Eine medikamentöse Hemmung des EGFR ist mit extrazellulär bindenden, monoklonalen anti-EGFR Antikörpern (mAb), oder mit membrangängigen Tyrosinkinase (TK)-Inhibitoren möglich (MENDELSON u. BASELGA 2000). Einige dieser Substanzen sind bereits für den klinischen Einsatz zugelassen. Als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapeutika führen diese Substanzen zu einer Proliferationshemmung und z.T. auch zur Regression bei verschiedenen soliden Tumoren (Übersichten in DANCEY (2004), MENDELSON u. BASELGA (2003)).

Das primäre Ziel einer Kombination aus Strahlentherapie und EGFR-Inhibition ist nicht die (temporäre) Proliferationshemmung, sondern die verstärkte Abtötung rezidivfähiger Tumorstammzellen (KRAUSE et al. 2006). Strahlenbiologische Mechanismen, die hierbei ausgenutzt werden können, sind unter anderem eine Hemmung der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden, eine zelluläre Radiosensibilisierung, eine Verringerung der Tumorphypoxie oder eine Reduktion der Repopulierung während einer Therapie (BAUMANN u. KRAUSE 2004, KRAUSE et al. 2006, BAUMANN et al. 2007).

Für den Einsatz von EGFR-Inhibitoren in Kombination mit einer hochdosierten, kurativ intendierten Strahlentherapie liegen neben präklinischen Experimenten und Phase I/II-Studien (Übersichten in HARARI u. HUANG (2004), MILAS et al. (2004)) auch Daten aus einer großen randomisierten klinischen Studie vor (BONNER et al. 2006). Diese zeigt eine Verbesserung der Tumorheilung und des Gesamtüberlebens bei kombinierter Behandlung mit dem mononukleären Antikörper Cetuximab (C225) gegenüber einer alleinigen Strahlentherapie bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region.

Für den klinischen Einsatz von EGFR-Inhibitoren während einer Strahlentherapie sind weitere Untersuchungen zu deren selektiven Wirkungen notwendig. In immunhistochemischen Studien von DÖRR (2000) und KASE (2001) an normaler muriner Mundschleimhaut findet man einen Anstieg der EGF- und EGFR-Expression während fraktionierter Bestrahlung. Demzufolge scheint das EGF/EGFR-System nicht nur an Regenerationsprozessen im Tumorgewebe, sondern auch im Normalgewebe beteiligt zu sein. Die vorliegende Arbeit soll mittels einer selektiven Hemmung des EGFR durch den Tyrosinkinase-Inhibitor (BIBX1382BF) überprüfen, inwieweit dieses System zur Repopulation im Normalgewebe beiträgt.

2.11 Keratinozyten-Wachstumsfaktor – KGF

2.11.1 Struktur und physiologische Funktion

Erstmals wird KGF durch RUBIN et al. (1989) als ein proliferations-stimulierender Faktor für epitheliale Zellen beschrieben. Das Molekulargewicht des gereinigten Proteins beträgt 26-28 kD (RUBIN et al. 1989, WERNER 1998). Da die DNA von KGF zu 30-45% mit sechs anderen Mitgliedern der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren übereinstimmt, wird KGF in diese Gruppe aufgenommen und alternativ als FGF-7 bezeichnet (FARRELL et al. 2002, IGARASHI et al. 1998, KELLER et al. 2004, WERNER et al. 1998). Die Übereinstimmung von 89,3% der DNA und 90,3% der Proteine zwischen dem Menschen und der Ratte bzw. Maus erklärt die Effektivität im Tierexperiment (DÖRR et al. 2002a).

Gebildet wird KGF im Wesentlichen durch mesenchymale Zellen, vor allem Fibroblasten (FARRELL et al. 2002, FINCH u. RUBIN 2006). Zielzellen sind epitheliale Zellen in einer Vielzahl von Geweben, wie Epidermis und Haarfollikel, oralem und gastrointestinalem Schleimhautepithel, Lungenepithel, Urothel, Prostataepithel, Drüsenepithel und Corneaepithel.

2.11.2 KGF-Rezeptor

Der Rezeptor für KGF (KGFR bzw. FGFR2IIIb) ist eine Tyrosinkinase, die vom fgfr-2-Gen kodiert wird (DÖRR u. LACMANN 2001, FARRELL et al. 2002, FINCH u. RUBIN 2006, IGARASHI et al. 1998, RUBIN et al. 1995, WERNER 1998). FGFR2IIIb bindet neben KGF (FGF-7), auch FGF-1, FGF-3 und FGF-10 (FARRELL et al. 2002, IGARASHI et al. 1998, KELLER et al. 2004, WERNER 1998). KGF fungiert als mesenchymal-epithelialer Regulator von Proliferation, Differenzierung und Migration (FARRELL et al. 2002, FINCH u. RUBIN 2006, RUBIN et al. 1989, WERNER et al. 1998).

2.11.3 In-vitro Versuche zur Wirkung von rHuKGF

Die Wirkung von rHuKGF wird in einer Vielzahl von in-vitro Experimenten untersucht. Es kann ein proliferations- und migrationsstimulierender Effekt auf humane epitheliale und fetale Alveolarepithelzellen (DÖRR 2003a, GIBBS et al. 2000, WERNER et al. 1998) demonstriert werden. Des Weiteren besteht der Effekt auch auf humane Bronchialepithelzellen (WERNER et al. 1998), Riechepithel (HILLE et al. 2003), Keratinozyten der Mäuseepidermis und der humanen Epidermis (DÖRR 2003a, NING et al. 1998, WERNER et al. 1998) sowie auf Keratinozyten der oralen Mukosa der Maus (DÖRR u. LACMANN 2001). Nach der Behandlung mit KGF wird an in-vitro rekonstruierter muriner Mukosa eine Zunahme der Epitheldicke und der Zellzahl gefunden (DÖRR u. LACMANN 2001). Eine andere Studie zeigt an menschlichen Keratinozyten einen signifikanten Anstieg der Koloniegröße (Zellzahl) bei gleichbleibender Koloniezahl nach Bestrahlung und rHuKGF-Gabe (DÖRR 2003a). Die Behandlung mit rHuKGF vor und nach Einzelzeitbestrahlung sowie vor und während fraktionierter Bestrahlung, führt zu einer signifikanten Reduktion der Strahlenantwort an in-vitro rekonstruiertem Epithel (DÖRR u. LACMANN 2001).

2.11.4 Wirkung von KGF auf normale, unbehandelte Gewebe

Bei einer systemischen Applikation von rekombinantem humanem KGF (rHuKGF) im Tiermodell kommt es zu einer Stimulation der Proliferation und zu einer Modulation von Migrations- und Differenzierungsprozessen in Epithelien. Dies äußert sich in einer Zunahme der Zellzahl und der Epitheldicke. Als Folge kann es zu einer Hyperplasie in verschiedenen Organen kommen (DÖRR u. LACMANN 2001, FARRELL et al. 2002, RUBIN et al. 1995). Bei experimentellen Untersuchungen an der Schleimhaut von Zunge, Wange, Oesophagus und Darm der Maus finden FARRELL et al. (2002) nach einmaliger bzw. mehrmaliger rHuKGF-Gabe eine deutliche Dickenzunahme aller epithelialen Schichten, bis hin zur Verdopplung. Des Weiteren kann ein Anstieg der keratohyalinen Granula und der intraepithelialen desmosomalen Verbindungen festgestellt werden (FARRELL et al. 2002, WERNER et al. 1998). Bei Makakken reicht eine 2-3tägige Behandlung mit Palifermin aus, um eine signifikante Induktion der Schleimhautproliferation zu erreichen (DÖRR 2003a).

Nach Ende der KGF-Gabe erfolgt der Abbau der im Überschuss produzierten Zellen in der Mundschleimhaut (Maus) durch Apoptose, mit einem Maximum nach zwei Tagen im Anschluss an die letzte Injektion (DÖRR u. LACMANN 2001). Dieser programmierte Zelltod findet normalerweise nur sehr selten im Plattenepithel der Mundschleimhaut statt. Bei Mensch und Maus beträgt der normale Apoptoseindex 0,1% (DÖRR 2003a).

2.11.5 Bedeutung bei der Wundheilung

Eine besondere Rolle spielt KGF bei der Wundheilung (KELLER et al. 2004, WERNER 1998). In der Haut von Mäusen wird experimentell ein drastischer Anstieg der Transkription des KGF-Rezeptors in der Dermis nachgewiesen (WERNER 1998). Bei chemisch induzierten Ulzera des Ösophagus (Ratte) kann an den Rändern der Läsionen eine massive Aktivierung von KGF und KGFR beobachtet werden (BAATAR et al. 2002). Die topische Applikation von rHuKGF auf epitheliale Verletzungen fördert die Wundheilung in der Haut (FARRELL et al. 2002, WERNER et al. 1998) und in einer Vielzahl anderer Gewebe. Mittels Gentransfer

kann eine Verbesserung der Wundheilung in verschiedenen Tiermodellen induziert werden (MARTI et al. 2008).

2.11.6 Wirkung von rHuKGF an der bestrahlten Mundschleimhaut

Die Modulation der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut durch rHuKGF wird in zahlreichen experimentellen Studien untersucht. Die systemische Applikation von rHuKGF in Verbindung mit einer Einzeitbestrahlung führt zu einer Verminderung des strahleninduzierten Zellverlustes (FARRELL et al. 2002). Die isoeffektive Dosis als Maß für die Strahlentoleranz, steigt im Mausmodell bei wiederholter KGF-Gabe signifikant um den Faktor 1.7-2.3, wobei die Gabe nach Bestrahlung effektiver ist (DÖRR u. LACMANN 2001, DÖRR et al. 2001, DÖRR et al. 2005a, FARRELL et al. 2002). KILIÇ et al. (2007) stellen fest, dass bei Einzeitbestrahlung ausschließlich wiederholte Injektionen zu einem signifikanten Anstieg der isoeffektiven Dosen führen, nicht jedoch einzelne Injektionen.

Unter konventionell fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy über eine Woche resultiert die Verabreichung von rHuKGF in einer Erhöhung der Strahlentoleranz, entsprechend einer Kompensation von 1-1,5 Dosisfraktionen á 3 Gy. Die rHuKGF-Gabe während der bestrahlungsfreien Wochenenden resultiert in einer Kompensation von 3-4 der 5 applizierten Fraktionen, d.h. 60-80% der gesamten fraktionierten Dosis in der ersten Behandlungswoche (DÖRR et al. 2002a, 2005a). Des Weiteren findet DÖRR et al. (2002a, 2005a, DÖRR 2003a), dass bei fraktionierter Bestrahlung eine einzelne Injektion genauso effektiv ist wie drei Injektionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen, unabhängig vom Tag der Injektion. In einem Dosisbereich bis 22,5 mg/kg wird bei der fraktionierten Bestrahlung über zwei Wochen eine signifikante Erhöhung des Effekts festgestellt; höhere Dosen haben keine weitere Steigerung zur Folge (DÖRR et al. 2005a, DÖRR et al. 2005d). Bei zwei Wochen Bestrahlung ist die rHuKGF-Administration vor Beginn und am Ende der Bestrahlung von Woche 1 und 2 am wirkungsvollsten (DÖRR et al. 2005a, DÖRR et al. 2005d). Die Gabe von rHuKGF zum Zeitpunkt eines klinisch manifesten Ulkus verlängert die Dauer der Reaktion geringgradig von 4.2 ± 0.9 Tagen auf 4.8 ± 0.8 Tage, was klinisch jedoch ohne Bedeutung ist (DÖRR et al. 2002c, DÖRR 2003a).

Auch bei der Kombination einer Radiochemotherapie mit Cisplatin (cDDP) und 5-Fluorourazil (5-FU) und der Behandlung mit rHuKGF kann ein mukoprotektiver Effekt gefunden werden. (DÖRR et al. 2005b). Dies gilt für Einzeit- und auch für täglich fraktionierte Bestrahlung über ein bzw. zwei Wochen.

2.11.7 Klinische Studien

In einer Phase I-Studie zur Überprüfung der Sicherheit, der Pharmakokinetik und der biologischen Aktivität an gesunden Probanden (DÖRR 2003a) wird rHuKGF als einzelne Injektion oder täglich über 3 Tage in Dosen zwischen 0.2 und 20 µg/kg pro Tag verabreicht. Die Gabe wird gut toleriert. Es wird ein triphasisches Serum-Profil mit einer sehr schnellen Verteilung gefunden. Die Ausscheidung erfolgt logarithmisch-linear mit einer Halbwertszeit von 4 Stunden. Eine Akkumulation von Palifermin kann nicht festgestellt werden. In bukkalen Schleimhautbiopsien, die nach 3 Tagen der Behandlung entnommen werden, kann mittels einer Ki-67 Färbung ein dosisabhängiger Anstieg der positiv gefärbten Zellen und der Mitosefiguren festgestellt werden, entsprechend einer Stimulation der Proliferation.

Eine randomisierte Phase I/II-Studie von BRIZEL et al. (2001) untersucht die mukoprotektiven Eigenschaften einer KGF-Behandlung bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, die mit einer Radiochemotherapie (5-FU, cDDP) behandelt werden. Es findet sich eine Verkürzung der Mukositisdauer von Grad 3-4 (RTOG/EORTC) von 11 auf 6,5 Tage.

In weiteren Phase I- und II-Studien an Patienten mit metastasierenden (MEROPOL et al. 2003) und fortgeschrittenen (DÖRR 2003a, FINCH u. RUBIN 2006) kolorektalen Karzinomen mit einer reinen Chemotherapie (5-FU) kann das Auftreten einer Mukositis von Grad 2-4 von 67% auf 43% ($p=0.06$) bzw. von 78% auf 32% ($p=0.001$) reduziert werden. HENKE et al. (2008) finden im Rahmen einer randomisierten, placebo-kontrollierten Phase II-Studie bei insgesamt 186 Patienten mit operierten Kopf-Hals-Tumoren eine signifikante Abnahme der Inzidenz konfluenter Mukositiden von 67% auf 51 %. Die Latenzzeit vom Beginn der Strahlentherapie bis zum Eintreten der Reaktionen verlängert sich von 32 auf 45 Tage.

Bei Leukämiepatienten, die zur Konditionierung für eine autologe Stammzell- bzw. Vorläuferzelltransplantation vorab mit Ganzkörperbestrahlung und Hochdosis-Chemotherapie behandelt werden, erfolgt in einer randomisierten Placebo-kontrollierten Phase I-Studie der Einsatz von Palifermin 3 Tage vor oder 3 Tage vor und nach der Konditionierung mit Tagesdosen von 5-80 µg/kg (DÖRR 2003a). Es wird eine Reduktion der Mukositis Grad 2-4 von 51% bei einer Dauer von durchschnittlich 4,6 Tagen auf 13% mit einer Dauer von 0,8 Tagen festgestellt. Auch SPIELBERGER et al. (2004) kann in einer Phase II-Studie an Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen eine Verkürzung der Mukositisdauer (WHO Grad 3-4) von 7,7 Tagen auf 4 Tage bei einer Palifermin-Behandlung vor und nach Bestrahlung, und auf 5 Tage bei ausschließlich vorheriger Gabe nachweisen. In weiteren klinischen Studien der Phase II und III an Patienten mit einer kombinierten Radiochemotherapie vor Stammzelltransplantation kann eine signifikante Reduktion der Mukositis Grad 3 und 4 (WHO) von 98% auf 63% festgestellt werden. Die durchschnittliche Dauer der Mukositis sinkt von 9 auf 3 Tage. Die Patienten berichten von geringeren Schmerzen im Mund- und Halsbereich, es werden weniger opioide Analgetika eingesetzt und die Anzahl an Patienten mit parenteraler Ernährung sinkt (SPIELBERGER et al. 2004).

In allen klinischen Studien wird die Verabreichung von Palifermin von den Patienten gut vertragen. Bei den Nebenwirkungen handelt es sich meist um einen gering- bis mittelgradigen, temporären Hautausschlag und eine übermäßige Speichelproduktion während der ersten drei Behandlungstage (BRIZEL et al. 2001). Des Weiteren wird bei allen Patienten ein vorübergehender asymptomatischer Anstieg der Serumlipase und -amylase nach dreimaliger Injektion beobachtet (DÖRR 2003a, FINCH u. RUBIN 2006, SPIELBERGER et al. 2004).

Nachgewiesen werden kann in allen oben aufgeführten Studien der schleimhautprotektive Effekt. Aufgrund dieser Ergebnisse wird rHuKGF (Palifermin, Kepivance™) in den USA 2004 für die Konditionierung bei Stammzelltransplantation zur Mukositisprophylaxe zugelassen (AMGEN 2005), in Europa für die gleiche Indikation 2006.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Die Genehmigung der Experimente erfolgt durch das Regierungspräsidium (jetzt Landesdirektion) Dresden unter dem Aktenzeichen 24-9168.11-1-2003-8 entsprechend der geltenden Tierschutzgesetzgebung.

Für die Versuche werden Mäuse (Wildtyp-Inzuchtstamm C3H/Neu) aus der Versuchstierzucht des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden verwendet. In vorherigen Studien (DÖRR u. LACMANN 2001) können keine Geschlechtsunterschiede in Bezug auf die strahleninduzierte Mukositis der Mundschleimhaut gefunden werden, deshalb werden männliche wie auch weibliche Tiere eingesetzt. Zu Beginn der jeweiligen Experimente betragen das Mindestalter der Tiere 2 Monate und das Mindestgewicht 20 g.

Die Haltung erfolgt in den Räumen des Experimentellen Zentrums unter spezifiziert pathogenfreien (SPF-) Bedingungen. Die getesteten Mikroorganismen finden sich im Anhang.

Die Luftfeuchtigkeit in den klimatisierten Haltungsräumen beträgt 40-60%, die Temperatur 21-24°C. Die künstliche Beleuchtung der Räume wird über ein Lichtprogramm mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden mit einer Hellphase von 7.00 Uhr – 19.00 Uhr MEZ gesteuert. Die Lichtqualität erfüllt die Vorgaben der entsprechenden Tierhaltungsvorschriften.

In Kunststoffkäfigen der Größe 3 (Makrolon[®], 1290D) der Herstellerfirma Tecniplast Pereg GmbH, Waldkraiburg, werden bis zu 10 Mäuse auf Sägespan-Einstreu (Ssniff bedding $\frac{3}{4}$ Faser, Firma Altrogge, Lage) gehalten. Ad libitum steht pelletiertes Mäuse-Standardfutter (Altromin 1326, Fa. Altrogge, Lage) und chloriertes Trinkwasser aus Standard-Kunststoff-Trinkflaschen zur Verfügung.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Bestrahlungsmethoden

Bei der Bestrahlung des Epithels der Zungenunterseite kommen zwei verschiedene Techniken zur Anwendung: die perkutane Bestrahlung (Schnauzenbestrahlung) und die lokale Bestrahlung der Zungenunterseite.

Mit der perkutanen Bestrahlung kann die gesamte Zungenunterseite bestrahlt werden, ohne das Epithel zu berühren. Eine Narkose der Tiere ist nicht notwendig. Durch diese Technik werden nur Dosen appliziert, die zu einer subklinischen Schädigung der Gewebe im Strahlengang führen. Die abschließende lokale Bestrahlung eines definierten Testfeldes an der Zungenunterseite löst mit dosisabhängiger Inzidenz einen makroskopisch auswertbaren, klinischen Strahleneffekt im Epithel aus.

3.2.1.1 Perkutane Bestrahlung

Die perkutane Bestrahlung der Mäusezungen wird mit einer Röntgenanlage Isovolt 320/20 (Fa. Seifert Röntgenwerke, Ahrensburg) durchgeführt (Abb. 3). In allen Versuchen beträgt die Röhrenspannung 200 kV und der Röhrenstrom 20 mA. Der Strahlengang ist vertikal. Die Filterung erfolgt durch das Berylliumfenster der Anlage sowie mittels 0,6 mm Kupfer und

1 mm Aluminium. Im Fokus-Objekt-Abstand (FOA) von 45,5 cm ergibt sich eine Dosisleistung von 0,9 Gy/min.

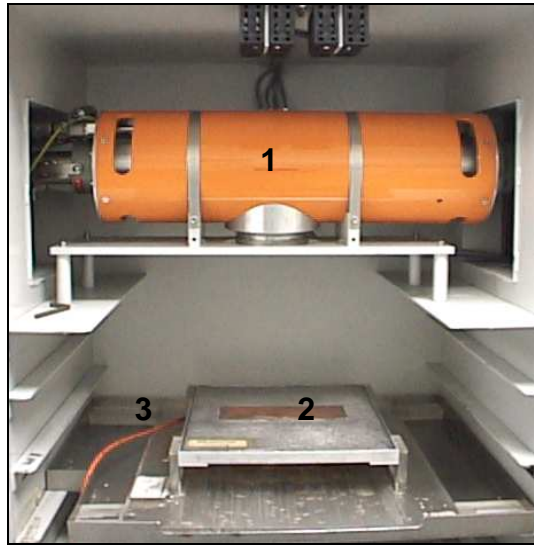


Abb. 3: Bestrahlungsanlage zur perkutanen Schnauzenbestrahlung (Anlage Isovolt 320/20)
Dargestellt ist die Röntgenröhre (1), die sich in einem Vollschutz-Gehäuse befindet, dessen Tür geöffnet ist. Unter der Röhre befindet sich in der entsprechenden Halterung die Abschirmplatte mit dem Bestrahlungsfenster (2). Der flexible Gummischlauch (3) der Dosimetrieinheit ist ebenfalls zu sehen.

Die Fixierung der Tiere erfolgt wie in Abbildung 4 dargestellt. Auf einer rechteckigen Plexiglasplatte mit einer Größe von 30x33 cm² sind 2x4 Kunststoffröhren (Innendurchmesser 2,8 cm) angeordnet, deren vorderen Abschluss jeweils ein Plexiglasblock mit 4 konischen Bohrungen bildet. Die Tiere werden in die Plastikröhren geleitet und die Schnauzen in den Bohrungen im Plexiglasblock fixiert. Eine Einschränkung der Atmung ist durch die Größe der Bohrung mit einer Verjüngung von 1 cm auf 0,6 cm ausgeschlossen. Ein Zurückweichen der Tiere während der Bestrahlung wird durch den rückwärtigen Verschluss der Röhren mittels Schaumstoffstopfen, die mit einer Aussparung zur Aufnahme des Schwanzes versehen sind, verhindert.

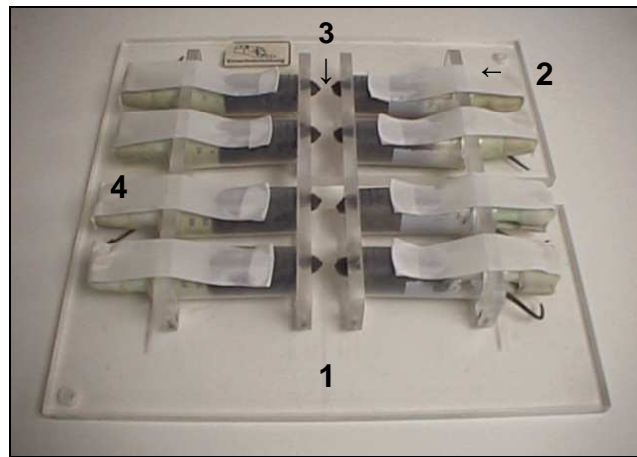


Abb. 4: Plexiglasplatte zur Fixierung der Versuchstiere und Positionierung der Schnauzen im Zentralstrahl

Auf der rechteckigen Plexiglasplatte (1) befinden sich 8 Kunststoffröhren (2) zur Fixierung der Versuchstiere. Die exakte Positionierung der Schnauzen im Zentralstrahl erfolgt in einer konischen Bohrung (3) in der Plexiglasleiste am vorderen Röhrenende. Das Zurückweichen der Tiere wird durch einen mittels Pflaster gesicherten Kunststoffstopfen (4) als rückwärtigem Verschluss verhindert.

Die exakte Positionierung der Schnauzen im Zentralstrahl wird durch die Halterung der Plexiglasplatte unter der Röntgenröhre gewährleistet (Abb. 3). Eine Kollimatorplatte aus der Legierung MCP-96 (Fa. HEK Medizintechnik, Lübeck), einem bleiäquivalenten Material, mit einer Länge von 33,5 cm, einer Breite von 30 cm und einer Stärke von 1,5 cm, schirmt den Tierkörper kaudal einer Ebene von den Augen zum Kehlgang ab. Ein 18,5x5,5 cm² großes Fenster in dieser Abschirmung definiert das Bestrahlungsfeld. Die oben erwähnte Strahlfilterung aus Kupfer und Aluminium ist in dieses Fenster integriert. Die Dosishomogenität zwischen den einzelnen Schnauzenpositionen beträgt $\pm 3\%$. Das Bestrahlungsfeld schließt die gesamte Zunge bis zum Zungengrund sicher ein.

Die Dosimetrie bei der Schnauzenbestrahlung wird mit einer Ionisationskammer Typ M23323 (Physikalisch-Technische-Werkstätten Dr. Pychlau GmbH, Freiburg) mit einem Kammervolumen von 0,1 cm³ durchgeführt. Die Kammer ist über einen flexiblen Gummischlauch (Abb. 3, Nr. 3) mit einem Dosimeter vom Typ Dosimentor SN 4 (Physikalisch-Technische-Werkstätten, Freiburg) verbunden. Entsprechend den Herstellerangaben erfolgt die Kalibrierung der Dosimetrieeinheit mit einer ⁹⁰Sr-Kontrollvorrichtung jeweils vor der Bestrahlung. Zur Bestrahlung befindet sich diese Ionisationskammer in schnauzengleicher Position im Zentralstrahl.

Nachdem in ausführlichen Testreihen die Konstanz der Dosisleistung nachgewiesen worden ist, kann die Zieldosis durch die Einstellung der Bestrahlungszeit festgelegt werden. Bei Erreichen der Zieldosis, d.h. nach Ablauf der vorgegebenen Zeit, schaltet sich die Röhre automatisch ab. Eine regelmäßige Kontrolle der Dosisleistung der Anlage wird durch die Medizophysiker der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie durchgeführt. Die Schwächung der Strahlung beim Durchtritt durch die Schädelstrukturen ist zu vernachlässigen (DÖRR 1997a). Das bedeutet, dass die gemessene Dosis der Dosis im Schleimhautepithel entspricht. Die Dosisverteilung innerhalb der Schleimhaut selbst ist homogen.

3.2.1.2 Lokale Bestrahlung der Zungenunterseite

Die lokale Bestrahlung der Zungenunterseite erfolgt mit einer Weichstrahl-Röntgenröhre vom Typ Darpac 150-MC (Forward Raytech, Ltd., Swindon, UK, siehe Abb. 5). Sie wird mit einer Röhrenspannung von 25 kV und einer Röhrenstromstärke von 20 mA betrieben. Die Dosisleistung im Fokus-Objekt-Abstand von 15 cm beträgt 4,43 Gy/min. Zur Filterung der Strahlung wird ein 0,3 mm dicker Aluminium-Filter benutzt.



Abb. 5: Röntgenröhre DARPAC-150 MC

Der Aluminiumblock (1) mit der Maus wird während der Lokalbestrahlung in der Halterung (2) unter dem Austrittsfenster der Röntgenröhre (3) befestigt. Zur exakten Positionierung der Zunge im Zentralstrahl dienen die Führungselemente für den Aluminiumblock (4).

Die Ruhigstellung der Tiere erfolgt durch eine Allgemeinnarkose mit Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Rhone Merieux, Laupheim, Deutschland) in einer Dosierung von ca. 60 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal. Die Immobilisierung tritt nach etwa 5 Minuten ein und dauert etwa 60 Minuten.

Um nur die Zunge bestrahlen zu können, wird der Tierkörper in einem quaderförmigen Aluminiumblock (13x4x4 cm) abgeschirmt. Die Tiere werden in Rückenlage in die zentrale zylindrische Bohrung (Durchmesser 2,5 cm) innerhalb des Aluminiumblockes verbracht (Abb. 6), nachdem die Zunge mit einer Pinzette aus der Mundhöhle vorverlagert worden ist. Im Dach des Blockes befindet sich eine kleine Bohrung (Durchmesser 3 mm), durch welche die Zunge mit der Pinzette vorsichtig nach außen geführt wird. Auf der Außenseite des Aluminiumblockes wird die Zungenoberseite auf Doppelklebeband und einem Pflasterstreifen an der Zungenspitze fixiert. Um eine Beeinträchtigung der Durchblutung durch Zug am Zungengrund zu vermeiden, wird der Kopf der Maus mit einem Styroporkeil unterstützt. Die Vorwärmung des Aluminiumblockes auf ca. 35 °C mit einem Heizkissen verhindert die Auskühlung der Tiere.

Durch das 3x3 mm² große Fenster in einem 20x40 mm² großen und 1 mm dicken Aluminiumplättchen wird das Bestrahlungsfeld zentral über der Zungenunterseite definiert. Die Zungenränder, der Zungengrund und der apikale Teil (1-1,5 mm) der Zunge werden abgeschirmt. Das Aluminiumplättchen besitzt an den Seitenrändern (5 mm) eine 1 mm dicke Erhöhung zum Schutz der Zunge vor Kompression.

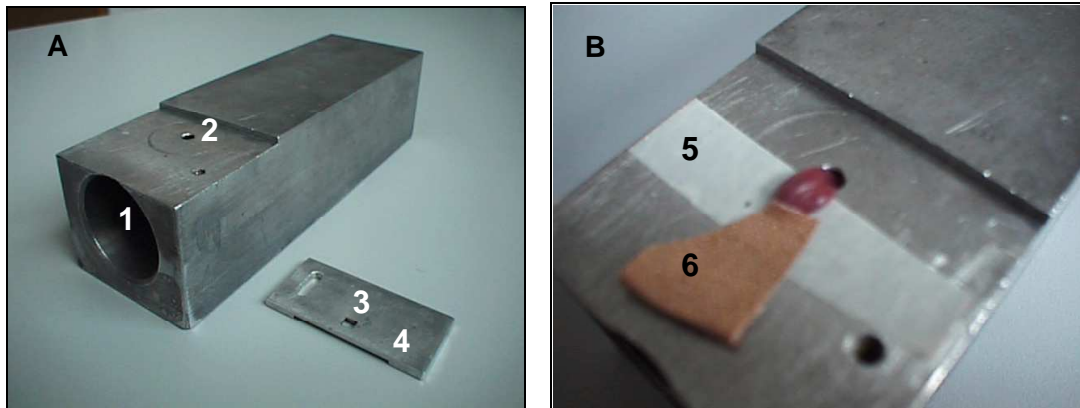


Abb. 6: Fixierung der Zunge zur Bestrahlung

In der zentralen Bohrung (A1) des Aluminiumblockes wird die Maus in Rückenlage platziert. Durch die Bohrung (A2) im Dach des Blockes kann die Zunge vorsichtig mit einer Pinzette nach außen geführt werden.

Die Zungenoberseite wird nun auf Doppelklebeband (B5) und zusätzlich mit einem Pflaster (B6) fixiert. Das lokale Bestrahlungsfeld wird durch ein 3x3 mm² großes Fenster (A3) in einem Aluminiumplättchen (A4) festgelegt, welches zentral über der Zungenunterseite positioniert wird.

Zur standardisierten Positionierung der Zunge im Zentralstrahl wird eine Haltevorrichtung für den Aluminiumblock benutzt, die fest an der Röntgenanlage installiert ist (Abb. 5).

An der Röntgenanlage vom Typ DARPA-150 MC wird die Dosis durch die Bestrahlungszeit definiert (Dosimetrie). Die Röntgenröhre schaltet sich nach Erreichen der eingestellten Zeit und somit der verschriebenen Zieldosis ab. Die Konstanz der Dosisleistung wird in regelmäßigen Messungen durch die Medizinphysiker der Klinik nachgewiesen. Da das Gerät auch zur Bestrahlung von Patienten dient, erfolgen regelmäßige Kontrollen und Wartungen durch die zuständigen Mitarbeiter der Medizinphysik entsprechend den Richtlinien zur Qualitätssicherung von strahlentechnischen Einrichtungen.

3.2.1.3 Klinische Beurteilung der Strahlenreaktion

Die Beurteilung der strahleninduzierten Veränderungen des Epithels der Zungenunterseite erfolgt makroskopisch unter Ultrakurznarkose der Tiere. Die Narkose wird mit Methohexital (Brevimylal®, Lilly, Giessen, Deutschland, 40 mg/kg i.p.) durchgeführt, die nach ca. 1,5 Minuten ihre Wirkung zeigt und über wenige Minuten anhält (DÖRR u. WEBER-FRISCH 1999). Während dieser Zeit kann die Zunge behutsam mit einer Pinzette aus der Mundhöhle vorgelagert und unter Kunstlicht (herkömmliche Schreibtisch-Halogenlampe) mit bloßem Auge beurteilt werden. Die Berührung des Bestrahlungsfeldes mit der Gefahr einer Traumatisierung wird vermieden.

Als klinische Erscheinungen an der Zungenunterseite werden die Parameter Rötung, Schwellung und die verstärkte Bildung von Hornschuppen (verstärkte Desquamation) in drei Schweregraden (+ bis +++) beurteilt und dokumentiert. Die verstärkte Desquamation führt zu einem typischen rauen Erscheinungsbild der Zungenoberfläche. Ulzerative Veränderungen werden als quantaler Effekt in einem Ja/Nein-Schema dokumentiert. Alle Versuchstiere werden täglich ab dem erstmaligen Auftreten klinischer Veränderungen bis zur vollständigen Reepithelialisierung aller ulzerativen Läsionen untersucht.

3.2.2 EGFR-Inhibitor

Als Hemmstoff des Rezeptors für den Epithelialen Wachstumsfaktor wird der Tyrosin-Kinase-Inhibitor BIBX1382BF (Fa. Boehringer Ingelheim Austria, Wien) verwendet. Verabreicht wird BIBX1382BF in einer Lösung von Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin in A. dest. (Aqua destillata) in einer Konzentration von 0,25 g/ml. Der Ansatz erfolgt unter Schütteln in 80% des Gesamtvolumens der Zuckerlösung bis eine homogene trübe Suspension entstanden ist. Danach werden 200 µl 1N HCL-Lösung tropfenweise zugegeben, bis die Lösung klar wird. Abschließend wird das Restvolumen der Zuckerlösung eingebracht. Die Lösung ist lichtdicht verpackt und bei Zimmertemperatur 3-4 Tage haltbar. Die Applikation der BIBX1382BF-Lösung erfolgt oral in einer Dosierung von 50 mg/kg mittels einer Schlundsonde (Knopfkanüle, gebogen, Außendurchmesser 1,2 mm, Länge 80 mm, Firma Eickemeyer, Tuttlingen). Dabei werden die Tiere im Nacken fixiert und durch die Spitze der Sonde im Rachen der Schluckreflex ausgelöst. So kann gewährleistet werden, dass die vorgesehene Dosis des Medikaments sicher und vollständig aufgenommen wird.

3.2.3 Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF)

Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) wird in Form von rHuKGF (recombinant human keratinocyte growth factor, Palifermin) durch die Firma AMGEN Inc. (Thousand Oaks, CA, USA) als Lyophilisat zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung des Wachstumsfaktors erfolgt mittels E. coli. Die Reinigung erfolgt bei AMGEN Inc. durch konventionelle Chromatographie.

An jedem Applikationstag wird Palifermin frisch zubereitet. Das Trockenpulver, in einer Menge von 6,25 mg pro Fläschchen, wird in 1,2 ml Lösungsmittel, welches ebenfalls von AMGEN Inc. zur Verfügung gestellt wird, gelöst. Dies ergibt ein Gesamtvolumen von 1,25 ml (5,0 mg/ml). Für die Experimente werden Dosierungen von 15 mg/kg und 22,5 mg/kg benötigt. Diese Dosierungen haben sich in unabhängigen Experimenten (DÖRR et al. 2005a, b, d) als optimal wirksam herausgestellt. Das Injektionsvolumen beträgt 0,05 ml/10g Körpergewicht, entsprechend 0,1–0,15 ml/Tier. Deshalb wird für eine Dosis von 15 mg/kg die Ausgangslösung durch Zugabe von 0,83 ml PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) verdünnt. Für die KGF-Dosis von 22,5 mg/kg erfolgt die Verdünnung mit 0,14 ml PBS.

Die Verabreichung von Palifermin erfolgt subkutan in die Nackenfalte.

3.3 Beschreibung der Experimente

3.3.1 Kontrollversuche

3.3.1.1 Lokale Einzeitbestrahlung (Versuche M1.x)

Die alleinige Einzeitbestrahlung im Versuch M1 dient der Definition der Strahlenreaktion der Zungenschleimhaut. Dieser Versuch findet sowohl zu Beginn (M1.1) als auch am Ende

(M1.2) der gesamten Versuchsreihe statt. Die Bestrahlung erfolgt jeweils in 5 gestaffelten Dosisgruppen mit je 10 Tieren. Die applizierten Dosen sind 6,0 Gy, 9,0 Gy, 11,0 Gy, 13,0 Gy und 16,0 Gy.

3.3.1.2 Applikation des EGFR-Inhibitors ohne/mit KGF (Versuche E0.x)

Die alleinige Verabreichung des EGFR-Inhibitors BIBX1382BF (Versuch E0.1) dient der Erfassung der Wirkung auf die Schleimhaut und das Allgemeinbefinden. Die Tiere erhalten BIBX1382BF in einer Dosis von 50 mg/kg p.o. jeweils einmal täglich am Tag 0-7.

Ziel der gemeinsamen Applikation des EGFR-Inhibitors und KGF (Versuch E0.2) ist die Erfassung der Wirkung und Verträglichkeit des EGFR-Inhibitors bei gleichzeitiger Verabreichung von KGF. BIBX1382BF wird wie in Versuch E0.1 in einer Dosis von 50 mg/kg p.o. einmal täglich von Tag 0-7 verabreicht. KGF wird subkutan in einer Dosis von 15 mg/kg an Tag -3 und 22,5 mg/kg an Tag +4 appliziert.

3.3.2 Fraktionierungsprotokolle

3.3.2.1 Bestrahlung mit 5x3 Gy, gefolgt von lokaler Testbestrahlung (Versuche F1.x)

Die Protokolle der Versuche F1.x sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die fraktionierte Bestrahlung erfolgt als Schnauzenbestrahlung mit 5 täglichen Fraktionen über 1 Woche (Tag 0-4). Die Dosis pro Fraktion beträgt 3 Gy. An Tag 7 erfolgt eine lokale Zungenbestrahlung mit gestaffelten Testdosen. So kann die Vorschädigung in einen klinisch manifesten, auswertbaren Effekt überführt werden. Die verwendeten Testdosen sind in Tabelle 7 aufgelistet. Im Versuch F1.1 erfolgt keine weitere Behandlung. Dagegen erhalten die Tiere im Versuch F1.2 den EGFR-Inhibitor BIBX1382BF in einer Dosis von 50 mg/kg p.o. jeweils 30 min nach Bestrahlung von Tag 0-7. In Versuch F1.3 wird zusätzlich KGF in einer Dosis von 15 mg/kg an Tag -3 und 22,5 mg/kg an Tag +4 ca. 60 min vor Bestrahlung subkutan verabreicht.

Tab. 7: Versuchsdesign F1.x

Versuch	BIBX1382BF	rHuKGF	Testdosen [Gy]	Tiere
F1.1	-	-	2,1; 3,4; 5,6; 7,7; 10,5	50
F1.2	Tag 0-7, 50 mg/kg	-	2,1; 3,4; 5,6; 7,7; 10,5	50
F1.3	Tag 0-7, 50 mg/kg	Tag -3, 15 mg/kg Tag +4, 22,5 mg/kg	5,5; 8,0; 10,0; 12,0; 14,4	50

3.3.2.2 Bestrahlung mit 10x3 Gy, gefolgt von lokaler Testbestrahlung (Versuche F2.x)

In den Versuchen F2.x (Tab. 8) erfolgt die fraktionierte Bestrahlung mit 10 Fraktionen über zwei Wochen (Tag 0-4, Tag 7-11) mit einem bestrahlungsfreien Wochenende. Die Dosis pro Fraktion beträgt 3 Gy. Die lokale Zungenbestrahlung mit gestaffelten Testdosen (Tab. 8) wird an Tag 14 durchgeführt. In den Versuchen F2.2 und F2.3 wird BIBX1382BF in der Dosis von 50 mg/kg von Tag 0-14 verabreicht. In Versuch F2.3 erhalten die Mäuse zusätzlich KGF an den Tagen -3 und +11 in einer Dosis von 15 mg/kg, an Tag +4 in einer Dosis von 22,5 mg/kg (Tab. 8).

Tab. 8: Versuchsdesign F2.x

Versuch	BIBX1382BF	rHuKGF	Testdosen [Gy]	Tiere
F2.1	-	-	2,7; 5,2; 7,2; 9,2; 11,7	50
F2.2	Tag 0-14, 50 mg/kg	-	5,0; 7,0; 8,5; 10,0; 12,0	50
F2.3	Tag 0-14, 50 mg/kg	Tag -3, 15 mg/kg Tag +4, 22,5 mg/kg Tag 11, 15 mg/kg	7,0; 9,0; 11,0; 13,0; 15,2	50

3.3.3 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

3.3.3.1 Bestrahlungsprotokolle

Für die histologischen Untersuchungen erfolgt die fraktionierte Bestrahlung sowie die Gabe von BIBX1382BF bzw. KGF analog zu F1 (Versuch H1) bzw. zu F2 (Versuch H2). In Versuch H1 werden täglich von Tag 0 (unbestrahlte Kontrolle) bis Tag 10 je 3 Zungen entnommen, in Versuch H2 von Tag 8 bis 17, da die Ergebnisse aus F1 auch für Tag 0-6 von F2 anwendbar sind.

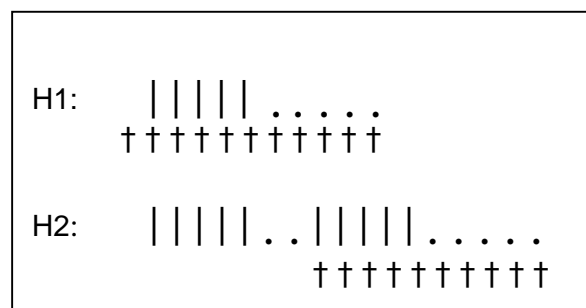


Abb. 7: Behandlungsprotokolle für die histologischen Untersuchungen

Die Strahlenbehandlung erfolgt mit 3 Gy pro Fraktion (|) an 5 Tagen in der Woche, gefolgt von bestrahlungsfreien Wochenendtagen (.). Die Zungenentnahme (†) findet in den Versuchen H1 von Tag 0-10 und H2 von Tag 8-17 statt.

3.3.3.2 Zungenentnahme und Fixierung

Sofort nach dem Töten der Tiere durch zervikale Dislokation erfolgt die Entnahme der Zungen. Der bewegliche Teil der Zunge wird mit einer Schere am Zungengrund abgetrennt. Die Fixierung erfolgt in Formalin für mindestens 24 Stunden. Anschließend werden die Zungen median mit einer Rasierklinge geteilt. Danach erfolgt die Dehydrierung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe in der Histonkinette (Leica EG 1160, Fa. Leica, Nussloch) und die abschließende Einbettung in Paraffin. Mit einem Mikrotom (Rotationsmikrotom 2065, Fa. Reichert-Jung, Nussloch) werden Schnitte mit einer Dicke von 3 µm angefertigt. Jeweils 2 Schnitte werden auf jedem Objektträger aufgebracht.

3.3.3.3 HE-Färbung

Von jeder Zunge wird jeweils ein Objektträger mit zwei Schnitten einer Standardfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE, Reagenzien siehe Anhang) entsprechend dem Protokoll in Tabelle 9 unterzogen.

Tab. 9: Protokoll für die HE-Färbung

Dauer	Arbeitsschritt
3x10 min	Xylol
je 1 min	absteigende Alkoholreihe
1 min	Aqua dest.
17 min	Mayers Hämalaun
5-10 min	fließendes Leitungswasser
8 min	Eosinlösung
2x1 min	Ethanol 96%
2x1 min	Ethanol absolutus
kurz eintauchen	Xylol
	Eindecken mit Entellan

3.3.3.4 TEC-3: Immunhistochemische Färbung

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers TEC-3 (Monoclonal Rat Anti-Mouse Ki-67 Antigen, Clone TEC-3, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) und der Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode wird das Proliferationsantigen Ki-67 markiert (Färbeprotokoll in Tab. 10). Die verwendeten Reagenzien sind im Anhang aufgelistet.

Im ersten Schritt werden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Danach folgt ein zweistündiges Wasserbad bei 90°C in einer Lösung aus Zitronensäure (0,1 M) und Na-Citratlösung (0,1 M). Nach dem Abkühlen und dem Spülen in PBS werden die Präparate in Wasserstoffperoxidlösung (30%) inkubiert. Im Anschluss an die Einwirkung des Normalserums vom Kaninchen, zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers, wird der Primärantikörper auf einen der beiden Schnitte aufgetragen. Der andere Schnitt fungiert als Negativkontrolle, indem anstelle des Antikörpers PBS aufgetragen wird. Der Primärantikörper verbleibt über Nacht auf den Präparaten. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wird mit DAB und Hämalaun gefärbt. Abschließend werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, kurz in Xylol getaucht und mit Entellan eingedeckt.

Tab. 10: TEC-3 Färbeprotokoll

Dauer	Arbeitsschritte
3 x 10 min	Xylol
je 1 min	absteigende Alkoholreihe
1 min	Küvette mit PBS
2 h	90°C-Wasserbad in einem Behältnis mit erwärmtem Zitratpuffer
30 min	im Zitratpuffer abkühlen
1 min	Küvette mit PBS
10 min	Küvette mit 2 ml H ₂ O ₂ (30%) und 200 ml PBS
15 min	Normalserum (bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren)
	Normalserum abklopfen
24 h	Primärantikörper (bei Raumtemperatur in feuchter Kammer)
2 x 5 min	in Küvette mit PBS waschen
20 min	Sekundärantikörper (bei 37°C in feuchter Kammer)
2 x 5 min	in Küvette mit PBS waschen
20 min	ABC-Komplex (bei 37°C in feuchter Kammer)
2 x 5 min	in Küvette mit PBS waschen
8 min	Küvette mit 20 ml DAB, 200 ml PBS und 20 µl H ₂ O ₂
	mit Leitungswasser spülen
1-2 min	Hämalaun
	2-3 mal mit Leitungswasser spülen
5 min	Küvette mit Leitungswasser
je 1 min	aufsteigende Alkoholreihe
kurz eintauchen	Xylol, anschließend mit Entellan eindecken

3.3.3.5 Cytokeratin 6: Immunhistochemische Färbung

Cytokeratin 6 wird mit dem monoklonalen Antikörper LHK6B (mouse monoclonal, Cytokeratin 6 antibody [LHK6B], Fa. Abcam, Cambridge, U.K.) und dem Animal Research Kit (DAKO ARK™, Peroxidase, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) angefärbt. Die Färbung basiert auf der Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode (Färbeprotokoll in Tab. 11). Die verwendeten Reagenzien sind im Anhang aufgelistet.

Die ersten Schritte finden analog zur Färbung mit TEC-3 statt. Danach folgt ein zweimaliges zehnminütiges Erhitzen in der Mikrowelle in einer Lösung aus Zitronensäure (0,1 M) und Na-Citratlösung (0,1 M). Nach dem Abkühlen und dem Spülen in PBS werden die Präparate mit einer vorbereiteten Peroxidaselösung des Animal Research Kits inkubiert. Im Anschluss daran wird das Biotinylierungsreagenz mit dem primären Antikörper auf einen der beiden Schnitte aufgetragen. Der andere Schnitt fungiert als Negativkontrolle, indem, anstelle des primären Antikörpers, PBS verwendet wird. Der Primärantikörper verbleibt 15 Minuten auf den Präparaten. Nach der Inkubation der Streptavidin-Peroxidase wird mit DAB+Substrate-Chromogen und Hämalaun gefärbt. Zum Schluss werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, kurz in Xylol getaucht und mit Entellan eingedeckt.

Tab. 11: Cytokeratin-6 Färbeprotokoll

Dauer	Arbeitsschritte
3 x 10 min	Xylol
je 1 min	absteigende Alkoholreihe
1 min	Küvette mit PBS
4 min	Zitratpuffer in Mikrowelle vorwärmen
2x10 min	im Zitratpuffer in Mikrowelle erhitzen
dazwischen 5 min	Abkühlen, verdampften Zitratpuffer auffüllen
30 min	im Zitratpuffer abkühlen
1 min	Küvette mit PBS
5 min	Peroxidaseblock (Bottle 1) einzeln auftragen und inkubieren
2x5 min	in Küvette mit PBS waschen
15 min	Biotinylierungsreagenz mit dem primären Antikörper inkubieren
2 x 5 min	in Küvette mit PBS waschen
15 min	Streptavidin-Peroxidase (Bottle 4)
2 x 5 min	in Küvette mit PBS waschen
5 min	DAB+Substrate-Chromogen, danach mit Leitungswasser spülen
1-2 min	Hämalaun, danach 2-3 mal mit Leitungswasser spülen
5 min	Küvette mit Leitungswasser
je 1 min	aufsteigende Alkoholreihe
2 x kurz eintauchen	Xylol, anschließend mit Entellan eindecken

3.3.3.6 Auswertung der Schnitte

Zur Auswertung der Präparate wird ein Lichtmikroskop (Axioplan, Fa. Zeiss Jena) verwendet. Das Epithel der Zungenunterseite wird vom Übergang des papillentragenden zum papillenfreien Epithel bis zum Zungengrund begutachtet. Mittels eines quadratischen Zählrasters, welches in 4x4 Quadrate unterteilt ist, werden die folgenden Parameter quantifiziert: Die Zelldichte wird durch die Auszählung der kernhaltigen Zellen in der postmitotischen (Funktions-)schicht und der Germinativschicht in den HE-gefärbten Schnitten bestimmt. Ebenfalls wird die Zahl der Mitosefiguren ermittelt. Die Bestimmung der Schichtdicken erfolgt einerseits für das gesamte Epithel und andererseits separat für die Germinativ-, Funktions- und Keratinschicht. Von der Zungenspitze aus wird mit Hilfe des quadratischen Zählrasters die Länge des Epithels in 10 Raster unterteilt. Die Messungen werden immer am zweiten, fünften und achten Raster durchgeführt. In den immunhistologischen Präparaten der TEC-3-Färbung werden alle positiv bräunlich gefärbten Zellen ausgewertet.

3.4 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute Inc., Cary, NC 1990).

3.4.1 Dosis-Effekt-Analysen

Dosis-Wirkungs-Analysen werden mittels Probit-Analyse (GOGOLOK et al. 1992, SAS Institute 1990) unter Annahme einer logarithmischen Verteilungsfunktion (Logit-Analyse) ohne Definition eines Schwellenwertes durchgeführt. Dadurch können sigmoide Dosis-Effekt-Kurven mit einem 95%-igen Vertrauensbereich für die Reaktionshäufigkeiten erstellt werden. Die ED₅₀ stellt diejenige Strahlendosis dar, bei der bei 50% der Versuchstiere eine Ulzeration

zu erwarten ist. Die statistische Streuung der ED₅₀ wird als Standardabweichung σ angegeben.

Der Vergleich von Dosis-Effekt-Beziehungen zur Abschätzung und Quantifizierung eines Unterschiedes zwischen zwei verschiedenen Untersuchungsgruppen erfolgt auf der Basis des Logit-Modells durch Maximum-likelihood-Analysen unter Verwendung des Likelihood-Ratio-Tests (SAS Institute 1990, SCHUEMER et al. 1990, EDWARDS 1992).

Ein p-Wert <0,05 wird als statistisch signifikanter Unterschied definiert.

3.4.2 Zeitlicher Verlauf

Den zeitlichen Verlauf der Strahlenreaktion beschreiben die Parameter Latenzzeit und Ulkusdauer. Die Latenzzeit definiert die Zeit vom Tag der Einzeit- bzw. Testbestrahlung (Top-up-Bestrahlung) bis zur ersten Diagnose einer Ulzeration. Die Zeitspanne zwischen der Erstdiagnose der Ulzeration und deren makroskopischer Ausheilung wird als Ulkusdauer bezeichnet. Aus den jeweiligen Einzelwerten aller positiv reagierenden Tiere pro Dosisgruppe sowie für jeden gesamten Versuch werden die arithmetischen Mittelwerte mit den Standardabweichungen bzw. Standardfehlern berechnet.

3.4.3 Histologische Untersuchungen

Die Auswertung der histologischen Untersuchungen wird durch die Bestimmung der Mittelwerte der jeweiligen Parameter für jedes Tier durchgeführt. Die Normierung der Werte von Zelldichte, Schichtdicke, Mitosen und der Anzahl der markierten Zellen erfolgt auf 1 mm Epithellänge. Dabei bleiben die üblichen, geringen Undulationen der Basalmembran des Epithels unberücksichtigt. Anschließend werden aus den individuellen Mittelwerten die Mittelwerte und der statistische Fehler pro Tag berechnet.

Aus Schichtdicke und Zellzahl kann das relative Zellvolumen im Vergleich zur unbehandelten Schleimhaut berechnet werden.

$$RV = \frac{SD / KW_{SD}}{ZZ / KW_{ZZ}} \times 100$$

RV...	Relatives Zellvolumen
SD...	Schichtdicke
KW _{SD}	Kontrollwert (natives Epithel)
ZZ...	Zellzahl,
KW _{ZZ}	Kontrollwert (natives Epithel)

4 Ergebnisse

4.1 Lokale Einzeitbestrahlung (Versuche M1/x)

Die Versuche M1/x dienen der Definition der Strahlenreaktion der Zungenschleimhaut. Die lokale Bestrahlung der Zungenunterseite findet mit gestaffelten Einzeldosen von 6 Gy bis 16 Gy statt. Es werden die Dosisabhängigkeit und der zeitliche Verlauf der Schleimhautreaktion in zwei unabhängigen Versuchen bestimmt.

Einen Überblick über die Ergebnisse der Versuche M1/1 und M1/2 gibt Tabelle 12.

Tab. 12: Zeitlicher Verlauf nach Einzeitbestrahlung (SD: Standardabweichung)

Dosis [Gy]	Anzahl der Reagenten		Latenz [Tage]		SD [Tage]		Ulkusdauer [Tage]		SD [Tage]	
	M1/1	M1/2	M1/1	M1/2	M1/1	M1/2	M1/1	M1/2	M1/1	M1/2
6	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1	1	10,0	10,0	-	-	2,0	2,0	-	-
11	6	4	9,3	9,8	0,5	1,0	2,2	2,5	0,4	0,6
13	6	7	8,7	9,6	0,8	0,5	2,3	3,3	0,5	0,5
16	9	10	9,0	9,0	0,7	0,7	2,9	3,2	0,6	0,6
	Gesamt		Mittlere Latenz				Mittlere Ulkusdauer			
	44		9,2		0,7		2,8		0,7	

4.1.1 Reaktion der Mundschleimhaut auf Einzeitbestrahlung

Sechs bis sieben Tage nach der Bestrahlung treten die ersten klinischen Veränderungen in Form einer diffusen Rötung und Schwellung im Testfeld der Zungenunterseite auf. Im weiteren Verlauf findet man eine Aufrauung des Epithels, typisch für eine verstärkte parakeratotische Desquamation. Aus dieser Phase entwickelt sich eine ulzerative Läsion, die von einer weißlichen, glatten, speckig-schimmernden Pseudomembran bedeckt ist. In Abbildung 8 ist der klinisch relevante Endpunkt der Untersuchung, eine Ulzeration im Testfeld der Zungenunterseite, dargestellt. Die Ulzeration ist normalerweise von einer typischen weißlichen Pseudomembran bedeckt, die für die Fotoaufnahme zur besseren Darstellung entfernt wird. Aus jeder der beschriebenen Phasen ist ein Übergang in die Heilung möglich.



Abb. 8: Ulzerative Läsion der Zungenunterseite nach lokaler Bestrahlung

Die Abbildung zeigt eine typische ulzerative Läsion der Zungenunterseite am elften Tag nach Testbestrahlung mit 16 Gy. Die weißliche Pseudomembran aus Fibrin und Zelldetritus wird zur besseren Darstellung entfernt (Quelle: DÖRR).

4.1.2 Dosisabhängigkeit

Die Dosis-Effekt-Kurven für die Testbestrahlungen sind gut definiert (Abb. 9). Im ersten Kontrollversuch (M1/1) wird ein ED_{50} -Wert von $12,2 \pm 1,7$ Gy (95%-Vertrauensbereich [10,7;13,9]) ermittelt, im zweiten Versuch (M1/2) beträgt die ED_{50} $11,7 \pm 1,1$ Gy (95%-Vertrauensbereich [10,5;12,9]). Die Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenzen ist signifikant (Probit-Analyse, $p_{M1/1}=0,0004/p_{M1/2}=0,0004$). Die Ergebnisse beider Kontrollversuche sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p=0,55$). Die gemeinsame Analyse beider Experimente ergibt eine ED_{50} von $11,9 \pm 1,4$ Gy (Probit-Analyse, Dosisabhängigkeit $p_{M1}=0,0001$).

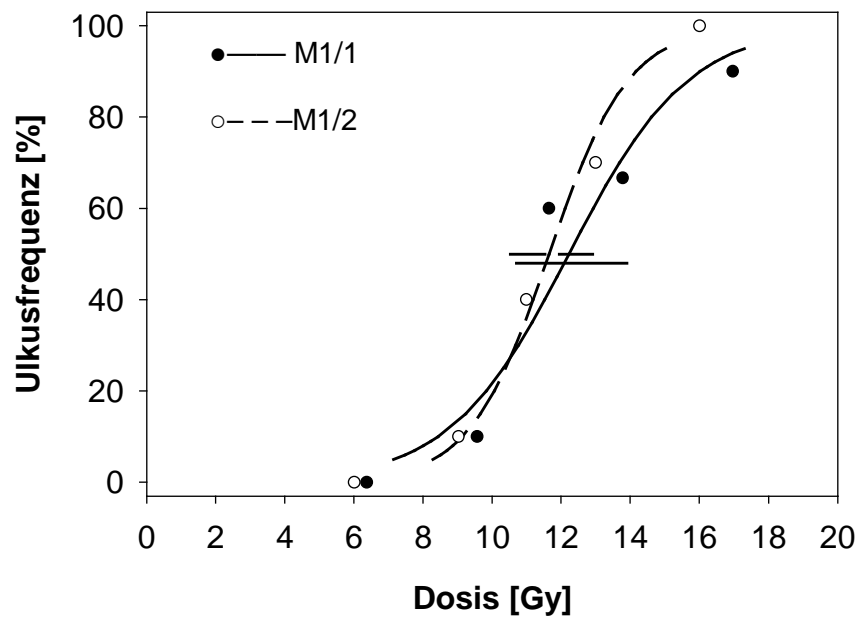


Abb. 9: Dosisabhängigkeit der Ulkusinzidenz nach Einzeitbestrahlung

Mittels Probit-Analyse werden die Dosis-Effekt-Kurven für die beiden Versuche mit Einzeitbestrahlung (M1/1, M1/2) berechnet. Die Querbalken stellen die Standardabweichung σ der ED_{50} dar. Die Punkte zeigen die beobachteten Ulkus-Inzidenzen.

4.1.3 Zeitlicher Verlauf

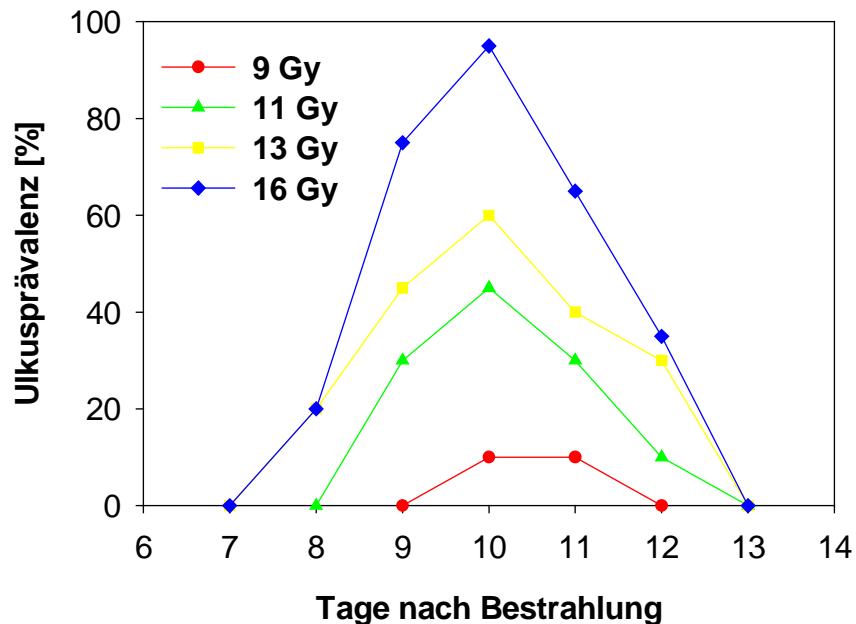


Abb. 10: Ulkusprävalenz nach Einzeitbestrahlung

Die Abbildung zeigt die Ulkusprävalenz nach lokaler Einzeitbestrahlung mit Dosen von 9 bis 16 Gy. Bei 6 Gy tritt kein Ulkus auf. Ab Tag 8 werden die ersten Ulzerationen beobachtet. Eine vollständige Reepithelisierung erfolgt bis spätestens Tag 13.

Die Prävalenz an Ulzerationen in den einzelnen Dosisgruppen ist – zusammengefasst für beide Versuche mit Einzeitbestrahlung – in Abbildung 10 illustriert. Erste Ulzera finden sich an Tag 8. Die maximale Prävalenz wird an Tag 10 gefunden. Bis Tag 13 sind alle Ulzerationen reepithelialisiert.

Nach einer mittleren Latenzzeit von $9,2 \pm 0,7$ Tagen (M1/1: $9,0 \pm 0,7$ Tage, M1/2: $9,4 \pm 0,7$ Tage) tritt die typische strahleninduzierte Ulzeration auf (Abb. 11). Dabei zeigt die Latenz keine signifikante Abhängigkeit von der Strahlendosis.

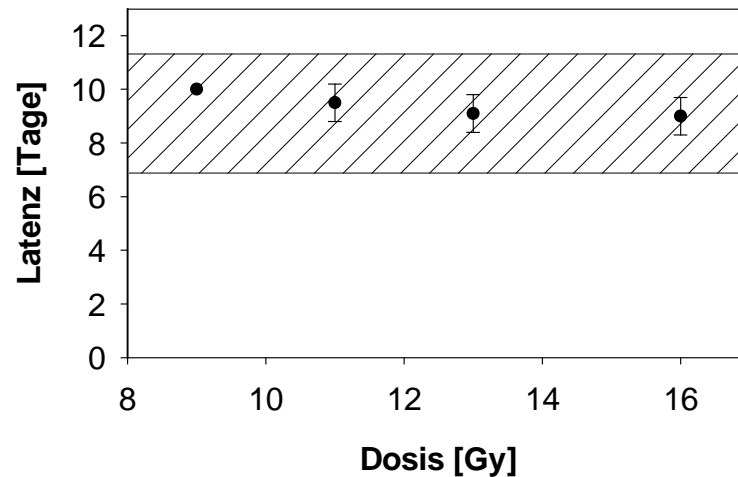


Abb. 11: Latenzzeit in Abhängigkeit von der Strahlendosis (M1/1+M1/2)

Die Abbildung zeigt die Dauer der Latenz (\pm SD) in den einzelnen Dosisgruppen, zusammengefasst für die beiden Versuche mit Einzeitbestrahlung. Die Latenzzeit ist unabhängig von der applizierten Dosis. Der schraffierte Bereich kennzeichnet den Mittelwert (\pm SD) aller Reagenten ($9,2 \pm 0,7$ Tage). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung in den verschiedenen Dosisgruppen wieder.

Die Ulzeration besteht über durchschnittlich $2,8 \pm 0,7$ Tage (M1/1: $2,5 \pm 0,6$ Tage, M1/2: $3,0 \pm 0,7$ Tage). Es zeigt sich ein Anstieg der Ulkusdauer mit steigender Dosis.

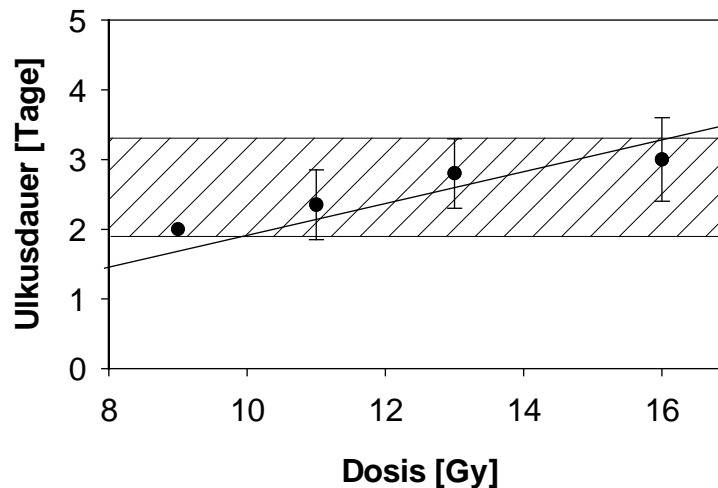


Abb. 12: Ulkusdauer in Abhängigkeit von der Strahlendosis (M1/1+M1/2)

Die Abbildung zeigt die Ulkusdauer in den einzelnen Dosisgruppen nach Einzelbestrahlung. Die Ulkusdauer ist dosisabhängig. Der Mittelwert (\pm SD) für alle Reagenten ($2,8 \pm 0,7$ Tage) ist als schraffierter Bereich angegeben. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Gruppenmittelwerte dar.

4.2 Applikation des EGFR-Inhibitors ohne/mit KGF (Versuch E0)

Der Versuch E0 dient der Erfassung der Wirkung von BIBX1382BF ohne/mit KGF auf die Schleimhaut und das Allgemeinbefinden der Tiere.

Der klinische Allgemeinzustand der Tiere ist über den gesamten Beobachtungszeitraum gut. Das Gewicht der Tiere ist nach anfänglichem Rückgang um ca. 20% konstant. Die Zungen der Tiere werden innerhalb des 14-tägigen Beobachtungszeitraums ab Tag 0 täglich in Nar-kose mit Methohexital-Natrium untersucht. Dabei zeigen sich keine Veränderungen.

4.3 Fraktionierte Bestrahlung

4.3.1 Alleinige Bestrahlung über 1 bzw. 2 Wochen (Versuch F1/1 bzw. F2/1)

Die fraktionierte Schnauzenbestrahlung in den Versuchen F1/1 und F2/1 erfolgt mit 5 Fraktionen pro Woche über 1 bzw. 2 Wochen. Die Dosis pro Fraktion beträgt 3 Gy. An Tag 7 bzw. 14 findet die lokale Testbestrahlung mit gestaffelten Dosen statt. Die Ergebnisse der alleinigen fraktionierten Bestrahlung sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Ergebnisse der alleinigen fraktionierten Bestrahlung im Vergleich zur Einzelbestrahlung (SD: Standardabweichung)

	ED ₅₀ [Gy]	σ^1 [Gy]	p _{Dosis} ²	Latenz ³ [Tage]	SD [Tage]	Dauer [Tage]	SD [Tage]
Einzelbestrahlung (M1/x)	11,9	1,4	0,0001	9,6	1,7	2,8	0,7
5x3 Gy Kontrolle (F1/1)	6,7	2,1	0,0006	9,0	1,1	2,8	0,7
10x3 Gy Kontrolle (F2/1)	6,5	1,9	0,0001	6,0	0,8	2,7	1,0

¹ Standardabweichung (σ) der ED₅₀

² Dosisabhängigkeit der Reaktion

³ bezogen auf den Tag der Testbestrahlung

Die Dosis-Effekt-Kurve für die Testbestrahlung über 1 Woche (F1/1) ist gut definiert (Abb. 13). Der ED_{50} -Wert beträgt $6,7 \pm 2,1$ Gy mit einem 95%-Vertrauensbereich von 5,1-8,8 Gy. Die Dosisabhängigkeit der Reaktion ist signifikant (Probit-Analyse, $p=0,0006$).

Die Dosis-effektkurve für die Testbestrahlung nach 5x3 Gy ist im Vergleich zur Einzeitbestrahlung deutlich nach links verschoben (Abb. 13). Die Linksverschiebung spiegelt den Effekt der fraktionierten Bestrahlung auf die Schleimhaut wider.

Die mittlere Latenzzeit beträgt $9,0 \pm 1,1$ Tage. Die mittlere Ulkusdauer beträgt $2,8 \pm 0,7$ Tage.

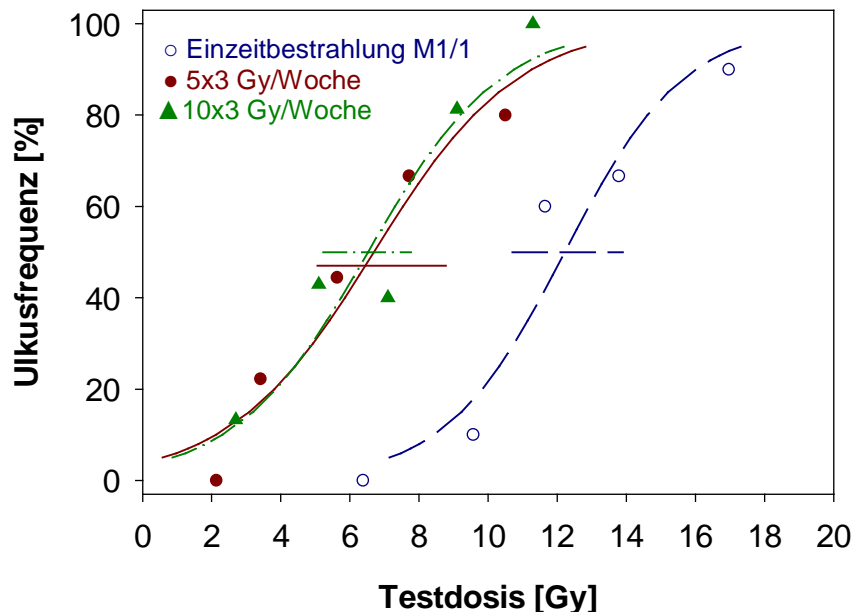


Abb. 13: Dosisabhängigkeit des Auftretens einer Ulzeration für die Testbestrahlung nach fraktionierter Bestrahlung mit 5 Fraktionen pro Woche über 1 bzw. 2 Wochen

Durch eine Probit-Analyse werden die Dosis-Effekt-Kurven ermittelt. Die Punkte stellen die beobachteten Ulkusinzidenzen dar. Der Fehlerbalken verdeutlicht den 95%-Vertrauensbereich des ED_{50} -Wertes. Die fraktionierte Dosis von 5x3 Gy bzw. 10x3 Gy wird bei der Darstellung nicht berücksichtigt. Zum Vergleich ist die Dosis-effektkurve für die Einzeitbestrahlung gezeigt.

Die Dosis-Effekt-Kurve für die Testbestrahlung nach 10x3 Gy/2 Wochen ist gut definiert (Abb. 13). Die Dosisabhängigkeit der Reaktion ist signifikant (Probit-Analyse, $p<0,0001$). Der ED_{50} -Wert beträgt $6,5 \pm 1,9$ Gy mit einem 95%-Vertrauensbereich von 5,2-7,8 Gy. Die Dosis-Effekt-Kurve unterscheidet sich damit nicht signifikant von derjenigen nach 5 Fraktionen/1 Woche ($p=0,87$).

Die mittlere Latenzzeit beträgt $6,0 \pm 0,8$ Tage. Die mittlere Ulkusdauer beträgt $2,7 \pm 1,0$ Tage. Somit ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Bestrahlung mit 5 Fraktionen über 1 Woche.

4.3.2 Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche und Applikation von BIBX1382BF ohne/mit KGF

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tab. 14: Ergebnisse der Bestrahlung mit 5x3 Gy und Applikation von BIBX1382BF und/oder KGF im Vergleich zur alleinigen fraktionierten Bestrahlung (SD: Standardabweichung)

	ED ₅₀ [Gy]	σ^1 [Gy]	p _{Dosis} ²	p _{vs.} ³ Kontrolle	Latenz ⁴ [Tage]	SD [Tage]	Dauer [Tage]	SD [Tage]
5x3 Gy Kontrolle (F1/1)	6,7	2,1	0,0006	-	9,0	1,1	2,8	0,7
5x3 Gy BIBX1382BF (F1/2)	8,3	1,6	0,0014	0,1197	8,4	1,2	2,5	0,8
5x3 Gy, KGF BIBX1382BF (F1/3)	11,3	1,3	0,0004	0,0003	7,8	1,1	2,5	0,8

¹ Standardabweichung (σ) der ED₅₀

² Dosisabhängigkeit der Reaktion

³ Unterschied zum Kontrollversuch

⁴ bezogen auf den Tag der Testbestrahlung

Bestrahlung mit 5x3 Gy und Applikation von BIBX1382BF (Versuch F1/2)

In Versuch F1/2 soll die Wirkung von BIBX1382BF auf die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut im Vergleich zur alleinigen fraktionierten Bestrahlung untersucht werden. Der EGFR-Inhibitor wird von Tag 0-7 in einer Dosis von 50 mg/kg etwa 30 min nach Bestrahlung oral verabreicht. Die Testbestrahlung erfolgt an Tag +7 mit gestaffelten Dosen.

Die Dosis-Effekt-Kurve ist gut definiert (Abb. 14). Der ED₅₀-Wert beträgt 8,3±1,6 Gy mit einem 95%-Vertrauensbereich von 6,7-10,3 Gy. Die Dosisabhängigkeit der Reaktion ist signifikant (Probit-Analyse, p=0,0014). Im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung ergibt sich kein signifikanter Unterschied (p=0,1197).

Die mittlere Latenzzeit beträgt 8,4±1,2 Tage. Die mittlere Dauer beträgt 2,5±0,8 Tage. Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant von denjenigen für die alleinige Bestrahlung.

Bestrahlung mit 5x3 Gy, Applikation von BIBX1382BF und KGF (Versuch F1/3)

In diesem Versuch wird die kombinierte Wirkung von BIBX1382BF und KGF auf die Dosisabhängigkeit und den zeitlichen Verlauf untersucht. Der EGFR-Inhibitor wird von Tag 0-7 in einer Dosis von 50 mg/kg etwa 30 min nach Bestrahlung oral verabreicht. KGF wird in einer Dosis von 15 mg/kg an Tag -3 und an Tag +4 in einer Dosis von 22,5 mg/kg etwa 1 Stunde vor Bestrahlung subkutan verabreicht. Die Testbestrahlung erfolgt an Tag +7 mit gestaffelten Dosen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Die Dosis-Effekt-Kurve ist gut definiert (Abb. 14). Der ED₅₀-Wert beträgt 11,3±1,3 Gy mit einem 95%-Vertrauensbereich von 10,1-12,6 Gy. Die Dosisabhängigkeit der Reaktion ist signifikant (Probit-Analyse, p=0,0004). Es besteht eine Rechtsverschiebung der Dosis-Effekt-Kurve im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (p_{F1/1}=0,0003) und zur Bestrahlung mit BIBX1382BF (p_{F1/2}=0,0049).

Die mittlere Latenzzeit beträgt 7,8±1,1 Tage. Die mittlere Ulkusdauer beträgt 2,5±0,8 Tage. Somit ergeben sich für den zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung oder zur Bestrahlung mit Gabe von BIBX1382BF.

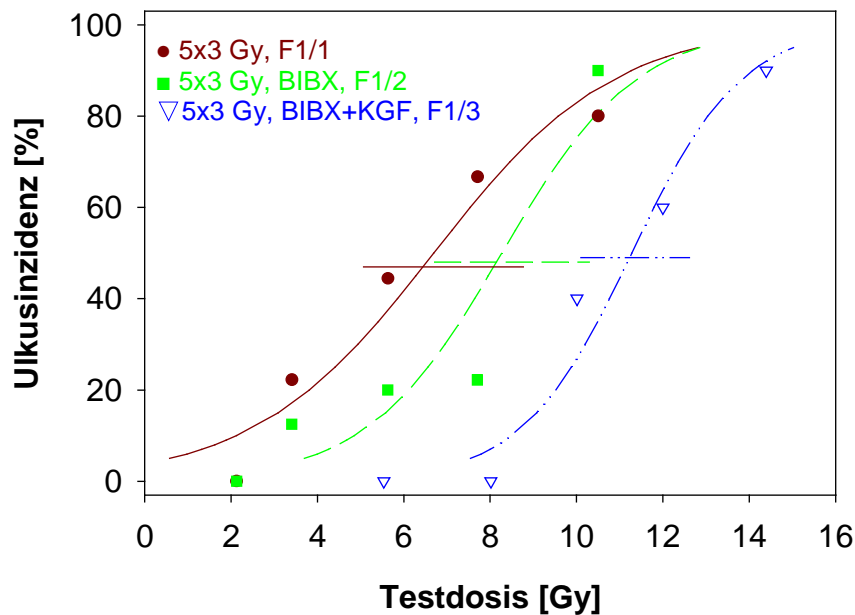


Abb. 14: Ulkusinduktion durch die Testbestrahlung nach fraktionierter Bestrahlung mit oder ohne BIBX1382BF- und KGF-Behandlung

Die Dosis-Effekt-Kurven werden mittels Probit-Analyse berechnet. Die Gabe von BIBX1382BF ergibt keine signifikante Modifikation der Dosis-Effekt-Kurve gegenüber der alleinigen Bestrahlung. Es besteht jedoch ein signifikanter Unterschied bei der Behandlung mit KGF gegenüber der alleinigen Bestrahlung F1/1 ($p=0,0003$) und auch gegenüber der Behandlung mit BIBX1382BF ($p=0,0049$). Die Punkte stellen die Ulkusinzidenzen dar. Die Fehlerbalken zeigen den 95%-Vertrauensbereich der ED_{50} -Werte. Die fraktionierte Dosis von 5x3 Gy wird bei der Darstellung nicht berücksichtigt.

4.3.3 Bestrahlung mit 10x3 Gy und Applikation von BIBX1382BF ohne/mit KGF

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Ergebnisse der Bestrahlung mit 10x3 Gy und Applikation von BIBX1382BF ohne/mit KGF im Vergleich zur alleinigen fraktionierten Bestrahlung (SD: Standardabweichung)

	ED_{50} [Gy]	σ^1 [Gy]	p_{Dosis}^2	$p_{vs.}^3$ Kontrolle	Latenz ⁴ [Tage]	SD [Tage]	Dauer [Tage]	SD [Tage]
10x3 Gy Kontrolle (F2/1)	6,5	1,9	0,0001	-	6,0	0,8	2,7	1,0
10x3 Gy BIBX1382BF (F2/2)	7,6	1,6	0,0008	0,2263	5,3	0,5	2,5	0,7
10x3 Gy, KGF BIBX1382BF (F2/3)	12,3	0,9	0,0004	<0,0001	8,7	1,0	3,1	0,9

¹ Standardabweichung (σ) der ED_{50} ;

² Dosisabhängigkeit der Reaktion;

³ Unterschied zum Kontrollversuch;

⁴ bezogen auf den Tag der Testbestrahlung

Bestrahlung mit 10x3 Gy und Applikation von BIBX1382BF (Versuch F2/2)

Die fraktionierte Schnauzenbestrahlung im Versuch F2/2 erfolgt mit 10 Fraktionen über 2 Wochen mit einer Dosis von je 3 Gy. An Tag 14 findet die lokale Testbestrahlung mit gestaffelten Dosen statt. An den Tagen 0-14 wird BIBX1382BF in einer Dosis von 50 mg/kg etwa 30 min nach Bestrahlung oral verabreicht. Die Ergebnisse sind im Vergleich zur alleinigen fraktionierten Bestrahlung über 2 Wochen in Tabelle 15 aufgeführt.

Die Dosis-Effekt-Kurve ist gut definiert (Abb. 15). Der ED_{50} -Wert beträgt $7,6 \pm 1,6$ Gy mit einem 95%-Vertrauensbereich von 6,0-8,9 Gy. Die Dosisabhängigkeit der Reaktion ist signifikant (Probit-Analyse, $p=0,0008$). Die Kurve unterscheidet sich nicht signifikant von derjenigen für die alleinige Bestrahlung ($p=0,2263$). Die mittlere Latenzzeit beträgt $5,3 \pm 0,5$ Tage und ist gegenüber der Kontrolle ($6,2 \pm 0,8$ Tage) signifikant reduziert ($p<0,0001$). Die Ulkusbauer beträgt $2,5 \pm 0,8$ Tage und ist nicht signifikant verschieden von derjenigen nach alleiniger Bestrahlung.

Bestrahlung mit 10x3 Gy, Applikation von BIBX1382BF und KGF (F2/3)

In diesem Versuch wird die kombinierte Wirkung von BIBX1382BF und KGF auf die Strahlenreaktion der Zungenunterseite nach zweiwöchiger fraktionierter Bestrahlung untersucht. Der EGFR-Inhibitor wird an den Tagen 0-14 in einer Dosis von 50 mg/kg etwa 30 min nach Bestrahlung oral verabreicht. KGF wird an Tag -3 in einer Dosis von 15 mg/kg, an Tag 4 in einer Dosis von 22,5 mg/kg und an Tag 11 in einer Dosis von 15 mg/kg etwa 1 Stunde vor Bestrahlung subkutan appliziert. Die Testbestrahlung erfolgt an Tag 14 mit gestaffelten Dosen.

Die Dosis-Effekt-Kurve ist gut definiert (Abb. 15). Der ED_{50} -Wert beträgt $12,3 \pm 0,9$ Gy mit einem 95%-Vertrauensbereich von 11,3-13,3 Gy (Tab. 15). Die Dosisabhängigkeit der Reaktion ist signifikant (Probit-Analyse, $p=0,0004$). Gegenüber der alleinigen Bestrahlung ($p<0,0001$) wie auch gegenüber der Bestrahlung und Gabe von BIBX1382BF ($p<0,0001$) führt die zusätzliche Applikation von KGF zu einer signifikanten Zunahme der isoeffektiven Dosen. Die ED_{50} entspricht nahezu derjenigen nach alleiniger Einzeitbestrahlung ($ED_{50}=11,9 \pm 1,4$).

Die mittlere Latenzzeit beträgt $8,7 \pm 1,1$ Tage. Gegenüber der alleinigen Bestrahlung ($p<0,0001$) wie auch gegenüber der Bestrahlung und Gabe von BIBX1382BF ($p<0,0001$) ist die Latenz signifikant länger. Als mittlere Ulkusbauer werden $3,1 \pm 0,9$ Tage ermittelt.

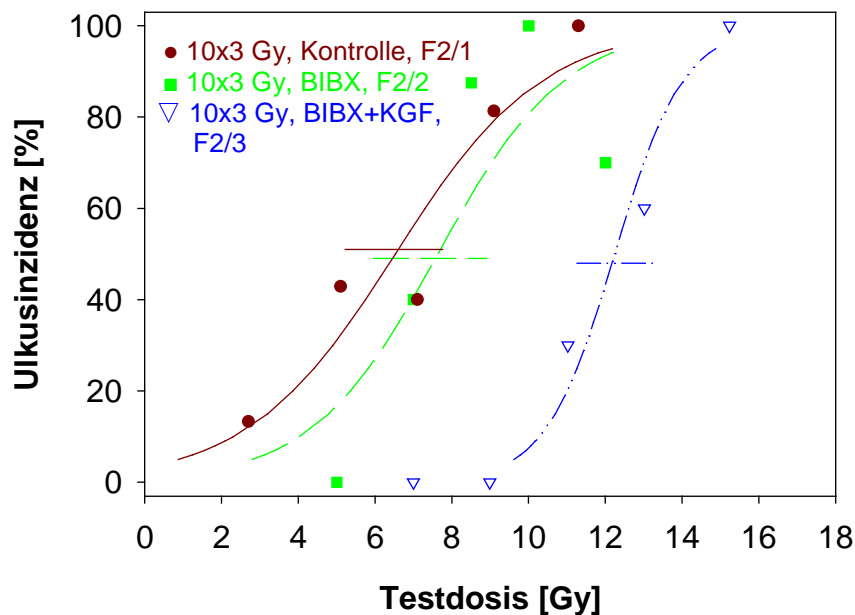


Abb. 15: Dosisabhängigkeit der Strahlenreaktion nach fraktionierter Bestrahlung über 2 Wochen mit oder ohne BIBX1382BF- und KGF-Behandlung und folgender Testbestrahlung.

Die Punkte stellen die Ulkuszinzidenzen dar. Die Fehlerbalken verdeutlichen den 95%-Vertrauensbereich der ED_{50} -Werte. Die fraktionierte Dosis von 10x3 Gy wird bei der Darstellung nicht berücksichtigt. Die Applikation von BIBX1382BF führt gegenüber der alleinigen Bestrahlung zu keiner signifikanten Verschiebung der Dosis-Effekt-Kurve. Für die zusätzliche KGF-Gabe ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) sowohl gegenüber der alleinigen Bestrahlung, als auch gegenüber der Bestrahlung und Gabe von BIBX1382BF.

4.4 Histomorphologie des bestrahlten Epithels

4.4.1 Einzeitbestrahlung

Die histologische Darstellung von unbehandeltem Epithel erfolgt bereits in Kap. 2.6.3. (Abb. 1). Nach einer Einzeit-Strahlenexposition kommt es histomorphologisch zu einer Vergrößerung der Einzelzellen. Die Kerne zeigen ab Tag 2 morphologische Veränderungen in Form von Karyopyknose, Karyorhexis, vereinzelt auch Karyolysis. Es sind zwei- und mehrkernige Zellen vorhanden. Das Maximum dieser Veränderungen findet sich an den Tagen 6-8 und ist zuerst in den germinativen Epithelschichten zu beobachten. Anschließend migrieren die abnormalen Zellen in die oberen Zellschichten. Es entstehen Veränderungen in der Keratinisierung, was sich einerseits in der Dickenzunahme der Keratinschicht und andererseits durch die Anwesenheit von kernhaltigen Zellen (Parakeratose) im Stratum corneum zeigt. In den oberen Lagen des Stratum corneum kommt es gleichzeitig zu einer Auflockerung, so dass die Oberfläche sehr uneben („ausgefranst“) erscheint.

Am Tag 9 nach Einzeitbestrahlung löst sich die Epithelschicht an einigen Stellen auf. Histologisch zeigt sich die Ulzeration ab Tag 10 als vollständiger fokaler Zellverlust (Abb. 16). Der Defekt ist von einer Pseudomembran aus Fibrin und Zelldetritus bedeckt. Die Regeneration des Epitheldefektes beginnt schnell von den Rändern des Expositionsfeldes aus. Nach einer kurzen Phase mit hyperplastischem Epithel kommt es zur vollständigen Ausheilung der Ul-

zeration. Ab Tag 8 ist bereits eine Hyperplasie des nicht strahlenexponierten Epithels am Rande des Bestrahlungsfeldes zu sehen.

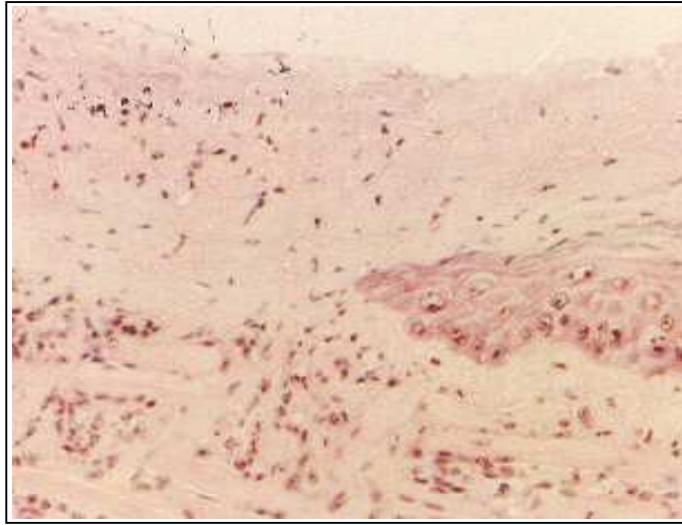


Abb. 16: Ulkus der Mundschleimhaut im histologischen Bild (HE-Färbung)

Im Bestrahlungsfeld (in der Abb. links) findet sich ein vollständiger Verlust des Epithels. Der Defekt ist von Zellresten und Fibrin bedeckt. Die Basalmembran ist zerstört. Am Rand des Ulkus (in der Abb. rechts), zeigen sich die Veränderungen des bestrahlten Epithels: verringerte Zelldichte, mehrkernige Zellen und zytomorphologische Abnormalitäten (Quelle: DÖRR).

4.4.2 Fraktionierte Bestrahlung

Abbildung 17 zeigt einen histologischen Schnitt des Zungenepithels nach Behandlung mit einer Gesamtdosis von 30 Gy, d.h. nach 10x3 Gy innerhalb von 2 Wochen. Im Vergleich zum unbehandelten Epithel (Abb. 1, Abschnitt 2.6.3) sind weder auffällige Veränderungen in der Gesamtdicke des Epithels nachzuweisen, noch sind deutliche zelluläre Schäden in wesentlichem Ausmaß zu erkennen. Bis zum Ende der ersten bzw. zum Beginn der zweiten Behandlungswoche kommt es zu einer dosisabhängigen Reduktion der Gesamtzellzahl auf 55% nach 5x3 Gy und 50% nach 5x4 Gy. Im weiteren Verlauf bleiben die Werte – trotz fortgesetzter Bestrahlung – durchschnittlich bei 60-70% der Werte des unbehandelten Kontrollepithels. An bestrahlungsfreien Wochenenden kommt es zu einem leichten Anstieg, auf den jeweils im Verlauf der folgenden Woche wieder eine entsprechende Reduktion folgt. Die Zellzahlen der Germinativschicht verhalten sich entsprechend denjenigen im Gesamtepithel. In der funktionellen Schicht findet ab der zweiten Woche eine Restauration der Zellzahl statt. Bei fortgesetzter Bestrahlung kommt es zu normalen bzw. erhöhten Zellzahlen. Die Zunahme der Gesamtzellzahl ist demzufolge im Wesentlichen auf eine Restauration der funktionellen Epithelschichten und nicht auf eine Expansion der proliferativen Zellpopulation zurückzuführen.

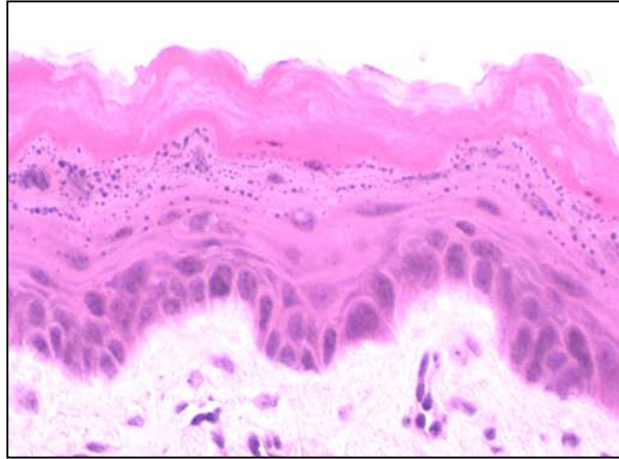


Abb. 17: Histologisches Bild der Zungenschleimhaut nach Bestrahlung mit 10x3 Gy über 2 Wochen (HE-Färbung).

Die geschichtete Gewebsarchitektur sowie die normale Dicke des Epithels sind im Vergleich zu unbestrahltem Epithel gut erhalten. Zytopathologische Veränderungen sind nicht in auffälliger Ausprägung vorhanden.

4.5 Quantitative Auswertung

4.5.1 Unbehandelte Schleimhaut

Die mittlere Zellzahl im Epithel der Zungenunterseite beträgt 578 ± 5 pro Millimeter Epithellänge (Tab. 16). In der Germinativschicht befinden sich davon 75% der Zellen ($431 \pm 6/\text{mm}$), in der Funktionsschicht 25% ($147 \pm 5/\text{mm}$). Gegen 10.00 Uhr, dem Zeitpunkt der Zungenentnahme, finden sich $0,5 \pm 0,1$ Mitosen pro Millimeter Epithel sowie 139 ± 49 TEC-3 positive Zellen. Insgesamt besitzt das Epithel eine durchschnittliche Dicke von $91 \pm 12 \mu\text{m}$. Davon nimmt die Germinativschicht 25% ein ($23 \pm 2 \mu\text{m}$), die Funktionsschicht mit $51 \pm 16 \mu\text{m}$ 56%. Der Anteil der kernlosen Keratinschicht beträgt 19% ($17 \pm 5 \mu\text{m}$).

Tab. 16: Histologische Parameter im nativen Epithel (n=3)

	Zellzahl/mm \pm SEM	Dicke \pm SEM [μm]
Germinativschicht	431 ± 6	23 ± 2
Funktionsschicht	147 ± 5	51 ± 16
Keratinschicht	-	17 ± 5
Gesamtes Epithel	578 ± 5	91 ± 12
Mitosen (10.00 Uhr)	$0,5 \pm 0,1$	-
Ki-67 positiv (TEC-3)	139 ± 49	-

4.5.2 Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche über 1 oder 2 Wochen

In den Versuchen H1 und H2 wird die Zellzahl und die Dicke des Epithels unter fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche bzw. 2 Wochen bestimmt. Zudem wird der Heilungsverlauf (ohne Testbestrahlung) nach 5x3 Gy (Tag 0-4) bis zum Tag 10, nach 10x3 Gy (Tag 0-4, 7-11) bis Tag 17 verfolgt. Dafür wird täglich bei drei Tieren um 10.00 Uhr die Zunge entnommen.

4.5.2.1 Zellzahlen

Abbildung 18 zeigt die Veränderung der Zellzahl unter sowie nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy an den Tagen 0-4. Die Einzelwerte finden sich in Tabelle 17 im Anhang.

Ab Tag 2 tritt eine deutliche Abnahme der *Gesamtzellzahl* ein, die in einem Minimum an Tag 6 mit 74% der Zellzahl des unbehandelten Gewebes mündet. In der *Germinativschicht* findet sich die minimale Zellzahl von 72% an Tag 6 nach Beginn der Bestrahlung, entsprechend einer Zellzahl von 311 ± 6 pro mm Epithellänge. In der *Funktionsschicht* zeigt sich die Abnahme der Zellzahl um ca. 1 Tag verzögert. Die geringste Zellzahl findet sich an Tag 6 und 7 mit 80%. Von Tag 6 bis 10 erfolgt eine Zunahme um insgesamt 144 Zellen/mm, entsprechend einer Steigerung um 36 Zellen/Tag. An Tag 10 ist das Epithel, bezogen auf die Zellzahl, vollständig wiederhergestellt. Dies gilt auch für die Veränderungen in den einzelnen Schichten.

Abbildung 19 zeigt die Veränderung der Zellzahl unter sowie nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy an den Tagen 0-4 und 7-11. Die Einzelwerte finden sich in Tabelle 18 im Anhang.

Ab der zweiten Woche der *alleinigen fraktionierten Bestrahlung* findet die Zellzahl ihr Minimum an Tag 9 bei 360 Zellen/mm Epithellänge, entsprechend 62% des Ausgangsniveaus. Im Zeitraum von Tag 9 bis 17 erfolgt eine Zunahme um 283 Zellen/mm, entsprechend einer durchschnittlichen Zunahme von 31 Zellen/mm/Tag. Ab Tag 15 steigt die Zellzahl weiter deutlich an und erreicht am Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 17) mit 111% (643 Zellen/mm) Normalwerte.

In der *Germinativschicht* zeigen sich die gleichen Veränderungen analog zum Gesamtepithel. Auch hier sind an Tag 9 die wenigsten Zellen mit 63% vorhanden. Die *Funktionsschicht* dagegen zeigt einen weniger starken Rückgang der Zellzahl, ebenfalls mit dem niedrigsten Wert an Tag 9.

In Versuch H1 wird weiterhin der Einfluss der alleinigen Gabe des EGFR-Inhibitors BIBX1382BF bzw. die gemeinsame Applikation mit KGF auf die Zellzahl bei fraktionierter Bestrahlung mit 5x3Gy/Woche untersucht. Abbildung 18 zeigt die Veränderung der Zellzahl unter sowie nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy und der oralen Gabe von BIBX1382BF. Die Einzelwerte finden sich in Tabelle 19 im Anhang.

Bei gleichzeitiger Gabe von BIBX1382BF verhält sich die Zellzahl fast gleichsinnig zur alleinigen Bestrahlung. Das Minimum an Zellen wird an Tag 5 mit 70% (405 ± 26 /mm Epithellänge) gefunden. In der Heilungsphase bis zum Tag 10 ist die Ausgangszellzahl wieder erreicht. Die Zunahme von 176 Zellen/mm zwischen Tag 6 und 10 ist mit 44 Zellen/Tag etwas höher als bei der alleinigen Bestrahlung. In der *Germinativschicht* wird die niedrigste Zellzahl mit 283 ± 14 Zellen, d.h. 66% der Zellen im Kontrollepithel an Tag 3 gefunden, und damit 3 Tage früher und deutlicher ausgeprägt, als bei alleiniger Bestrahlung. In der *Funktionsschicht* zeigt sich ein Minimum von 65% der Zellen an Tag 7. Damit entspricht der zeitliche Verlauf in dieser Schicht der alleinigen Bestrahlung. Das Ausmaß ist jedoch etwas stärker ausgeprägt.

Abbildung 18 zeigt die Veränderungen der Zellzahl unter sowie nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy, der Gabe von BIBX1382BF und KGF. Die Einzelwerte finden sich in Tabelle 20 im Anhang. Bei der zusätzlichen Gabe von KGF an Tag -3 wird eine leichte Zunahme der

Zellzahlen an den Tagen 1 und 2 beobachtet. Dann folgt eine deutliche Reduktion mit einem Minimum von 68% an Tag 4 und somit gegenüber der BIBX1382BF-Behandlung um 1 Tag verzögert, jedoch in einem vergleichbaren Ausmaß. Die folgende Restitution erfolgt sehr rasch und führt schon an Tag 5 zu Zellzahlen von 96% des Kontrollwertes. Bis zum Tag 10 findet sich eine Hyperplasie des Epithels mit Zellzahlen bis zu 126%. Es erfolgt somit zwischen Tag 4 und 5 eine Zunahme um 158 Zellen, anschließend zwischen Tag 5 und 6 von 125 Zellen. KGF bewirkt somit, neben einer leichten Hyperplasie direkt nach der Injektion eine deutliche Beschleunigung der Regenerationsvorgänge nach der maximalen (histologischen) Ausprägung der Strahlenreaktion.

Im Unterschied zur Zellzahl im Gesamtepithel wird in der *Germinativschicht* in den ersten Tagen keine Zunahme beobachtet. Der maximale Zellverlust ist an Tag 4 mit 65% der Zellen vergleichbar zur Gesamtzellzahl. In der *Funktionsschicht* findet sich dagegen in den ersten Tagen eine Zunahme der Zellzahl auf bis zu 148%.

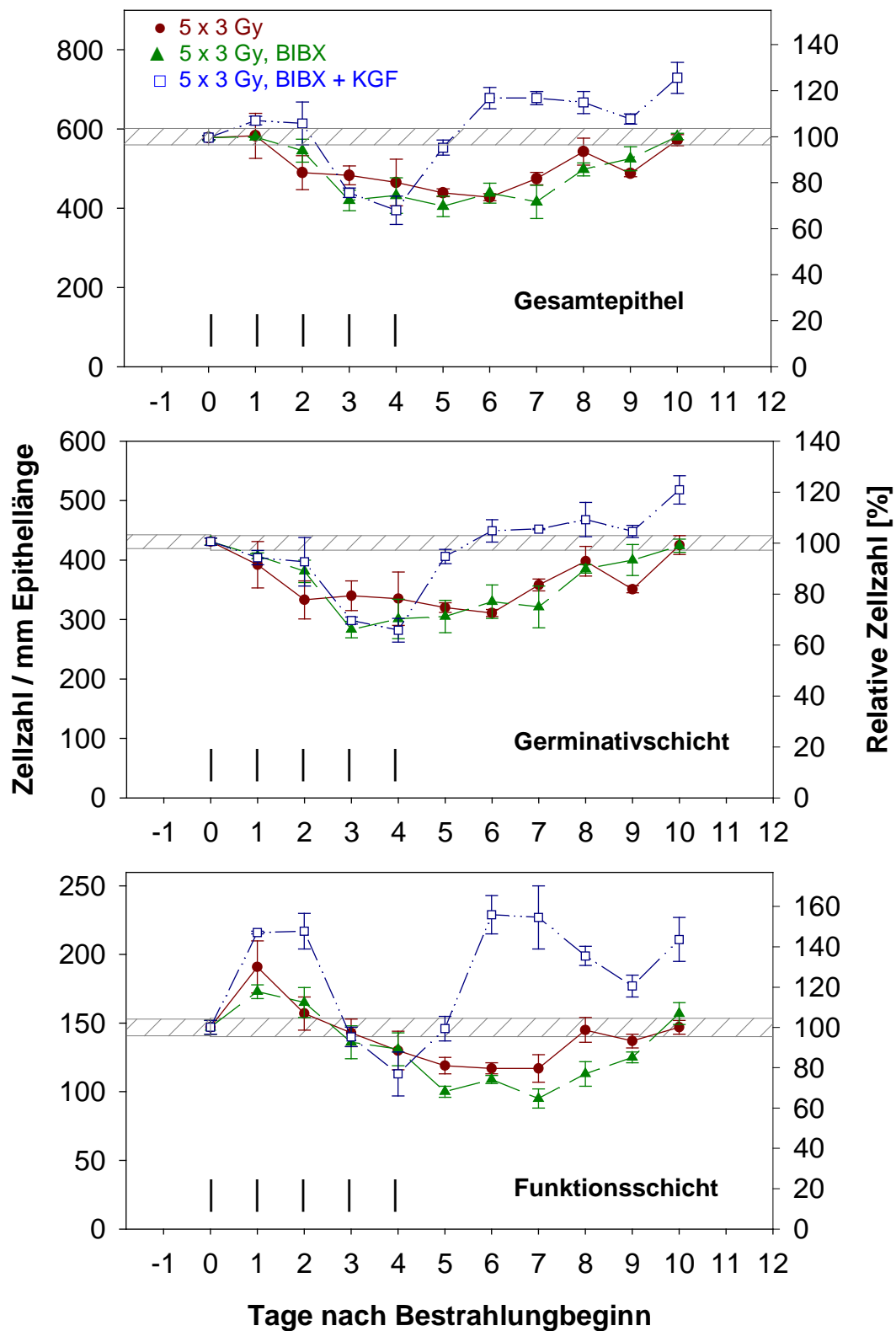


Abb. 18: Zellzahlen während und nach Bestrahlung mit 5x3 Gy

In der Abbildung sind die Veränderungen der Zellzahl im gesamten Epithel (obere Abb.) und getrennt für die Germinativschicht (mittlere Abb.) und Funktionsschicht (untere Abb.) als Mittelwert von je drei Tieren pro Tag dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM). Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Kontrolle mit Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll (|) ist oberhalb der Abszisse angegeben.

In Versuch H2 wird der Einfluss der alleinigen Gabe des EGFR-Inhibitors BIBX1382BF bzw. die gemeinsame Applikation mit KGF auf die Zellzahl bei fraktionierter Bestrahlung mit 10x3Gy/2 Wochen untersucht. Abbildung 19 zeigt die Veränderung der Zellzahl unter sowie nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy und der oralen Gabe von BIBX1382BF. Die Einzelwerte finden sich in Tabelle 21 im Anhang.

Der Verlauf der Zellzahlen bei zusätzlicher Gabe von BIBX1382BF ist demjenigen nach alleiniger fraktionierter Bestrahlung vergleichbar. Das Minimum an Zellen ist schon an Tag 8 mit 362 Zellen/mm (63%) erreicht und bleibt bis zum Tag 14 auf annähernd gleichem Niveau. Anschließend erfolgt ein deutlicher Anstieg auf 113% an Tag 17. Insgesamt kann ein Anstieg von 291 Zellen/mm festgestellt werden, was einer täglichen Zunahme von 32 Zellen/mm entspricht. Die *Germinativschicht* und die *funktionelle Schicht* zeigen gleiches Verhalten wie das Gesamtepithel.

Bei der kombinierten Gabe von BIBX1382BF und KGF (Abb. 19) ist die Zellzahl an Tag 8 auf einem hohen Niveau bei 671 ± 34 , was einer relativen Anzahl von 116% entspricht. Ihr Minimum findet die Gesamtzellzahl an Tag 11 mit 77% der Ausgangszellzahl. An diesem Tag wird die 3. Palifermininjektion verabreicht. Danach erfolgt ein steiler Anstieg auf supranormale Werte von 709 ± 63 Zellen/mm Epithellänge (123%) an Tag 13. Bis zum 17. Tag bleiben die Werte im bzw. geringfügig über dem Ausgangsniveau. Die Zellzahlen der *Germinativschicht* und der *funktionellen Schicht* verhalten sich annähernd gleich zum Gesamtepithel.

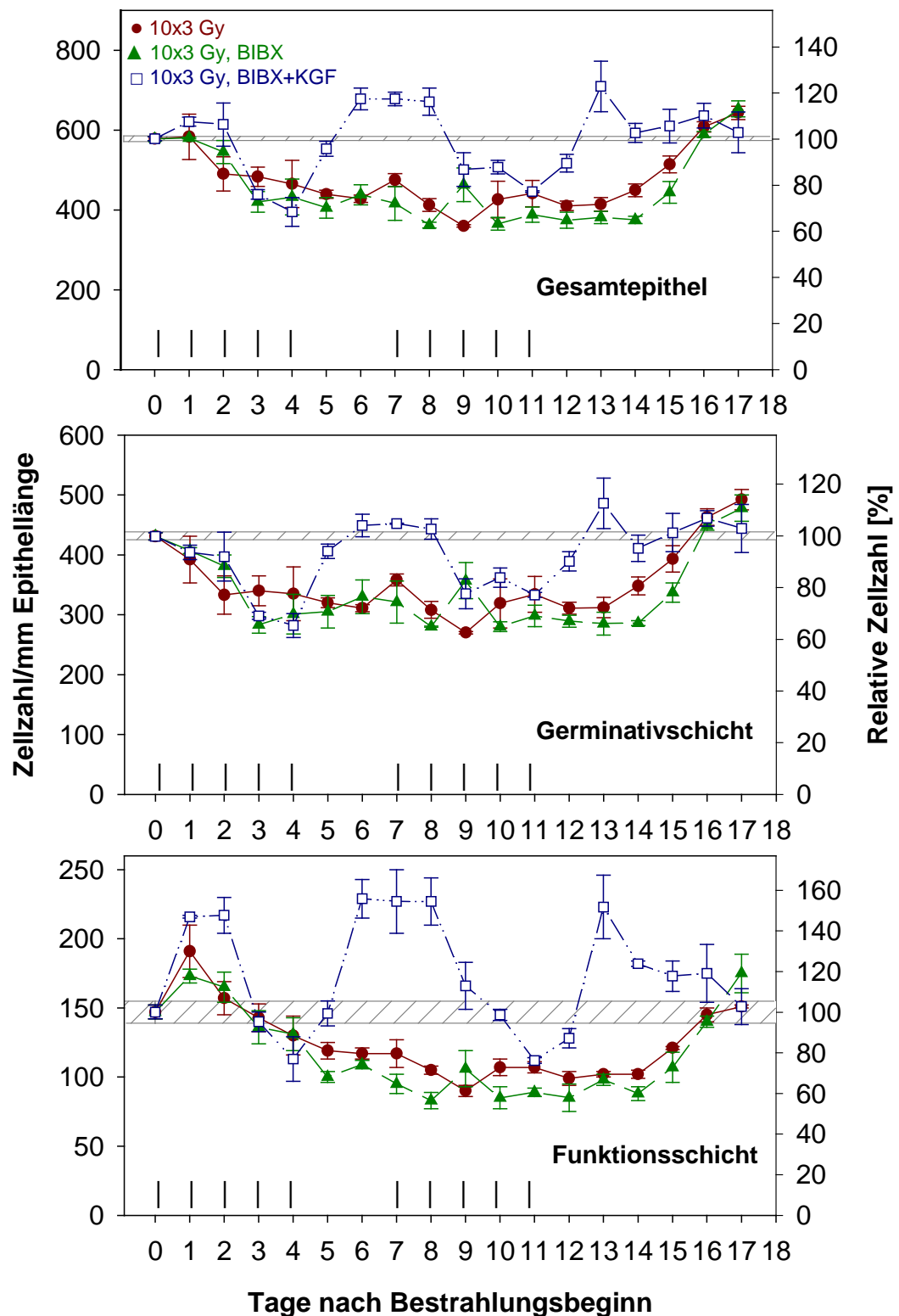


Abb. 19: Zellzahlen während und nach Bestrahlung mit 10x3 Gy

In der Abbildung sind die Veränderungen der Zellzahl im gesamten Epithel (obere Abb.) und getrennt für die Germinativschicht (mittlere Abb.) und Funktionsschicht (untere Abb.) als Mittelwert von je drei Tieren pro Tag dargestellt. Die Fehlerbalken verdeutlichen den Standardfehler (SEM). Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Kontrolle mit Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll (|) mit 10x3 Gy ist oberhalb der Abszisse angegeben.

4.5.2.2 Epitheldicken

In Abbildung 20 sind die Veränderungen der Dicke des Gesamtepithels der Zungenunterseite im zeitlichen Verlauf bei fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche dargestellt. Die Werte sind im Einzelnen in Tabelle 23 (Anhang) zusammengefasst.

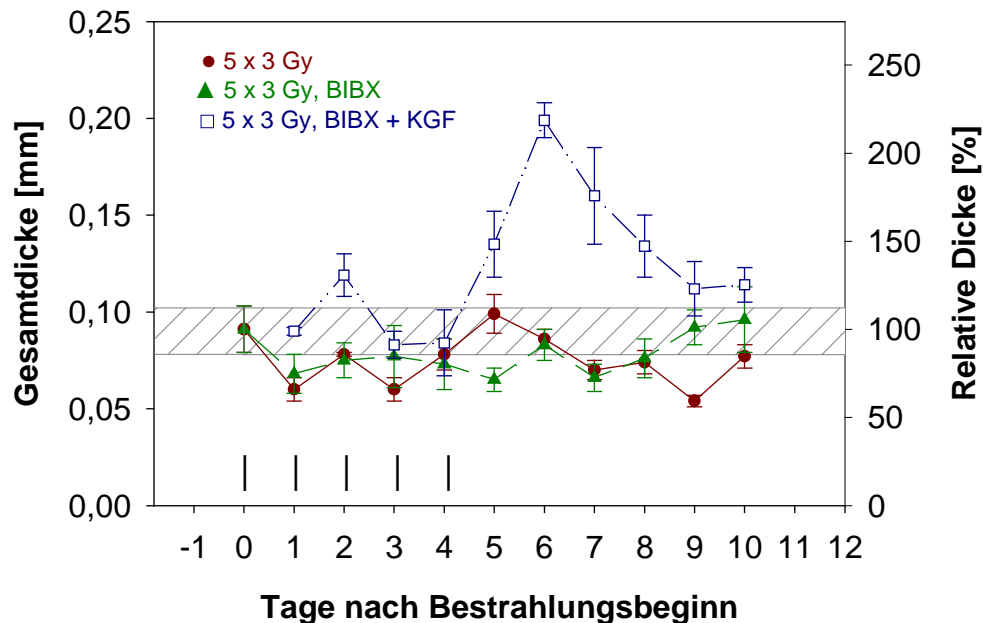


Abb. 20: Gesamtepitheldicke während und nach Bestrahlung mit 5x3 Gy

In der Abbildung ist der Verlauf der Epitheldicke als Mittelwert von je drei Tieren pro Tag dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Bei der alleinigen Gabe von BIBX1382BF (50 mg/kg, Tag 0-7) in Verbindung mit Bestrahlung sind kaum Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle zu finden. Die kombinierte Gabe von fraktionierter Bestrahlung BIBX1382BF und KGF (15 mg/kg an Tag -3, 22,5 mg/kg an Tag +4) führt zu einem signifikanten Anstieg der Dicke an Tag 2 sowie den Tagen 5-8. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Kontrolle mit Standardfehler.

Bei *alleiniger fraktionierter Bestrahlung* nimmt die Dicke des Epithels in den ersten Tagen bis auf 66% ab. An Tag 5 ist ein Anstieg der Epitheldicke auf Normalwerte zu verzeichnen, bis zum Tag 10 bleiben die Werte normal bis subnormal.

In Abbildung 23 sind die einzelnen Epithelschichten getrennt dargestellt. Die *Germinativ-* und *funktionelle Schicht* nehmen gleichermaßen geringfügig ab. Die Germinativschicht hat sich schon an Tag 2 wieder erholt, dagegen zeigt die funktionelle Schicht erst an Tag 5 wieder Werte des nativen Epithels. Am letzten Beobachtungstag haben beide Schichten wieder Ausgangsstärke erreicht. Die *Keratinschicht* dagegen zeigt bis zum Tag 6 eine Dickenzunahme. Bis zum Tag 10 sind die Werte wieder auf die des nativen Epithels gefallen.

In Abbildung 21 sind die Veränderungen der Dicke des Epithels der Zungenunterseite im zeitlichen Verlauf bei fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy/2 Wochen dargestellt. Die Werte sind im Einzelnen in Tabelle 24 (Anhang) zusammengefasst.

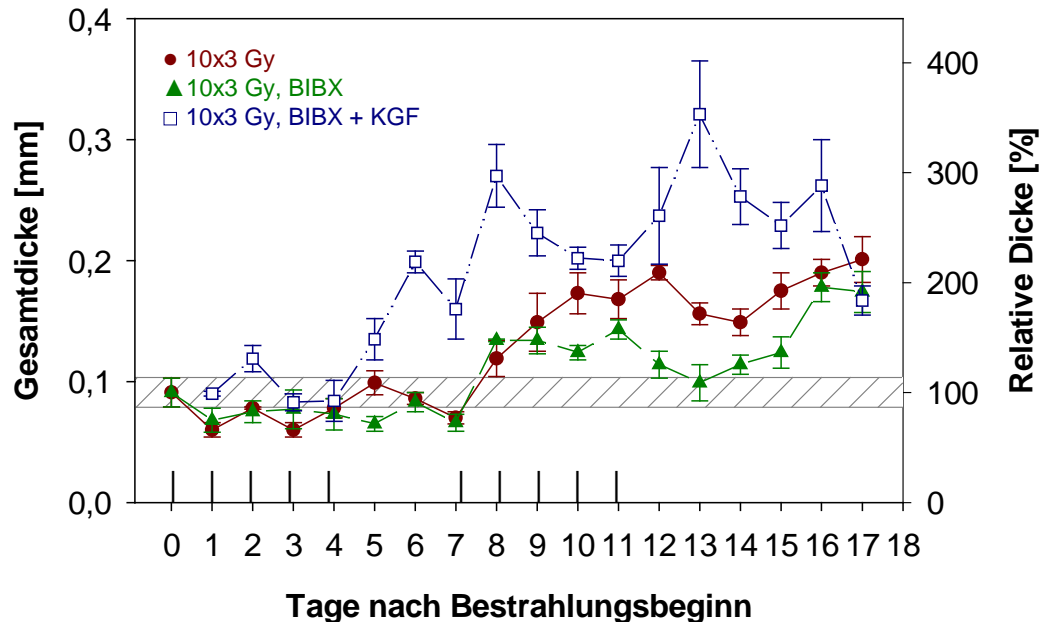


Abb. 21: Gesamtepitheldicke während und nach Bestrahlung mit 10x3 Gy

In der Abbildung sind die Veränderungen der Epitheldicke als Mittelwert von je drei Tieren pro Tag dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Bei der alleinigen Gabe von BIBX1382BF (50 mg/kg, Tag 0-7) sind geringere Epitheldicken vorhanden, als bei alleiniger Bestrahlung, aber immer noch höhere Werte im Vergleich zur Kontrolle. Die kombinierte Gabe von BIBX1382BF und KGF (15 mg/kg an Tag -3 und 11, 22,5 mg/kg an Tag +4) führt zu einem signifikanten Anstieg der Epitheldicke an den Tagen 8-9 und 13-16. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Kontrolle mit Standardfehler.

Bei *alleiniger fraktionierter Bestrahlung* ist schon an Tag 8 eine Dickenzunahme auf 131% gegenüber dem nativen Epithel vorhanden. Anschließend erfolgt eine Verdopplung der Dicke bis zum Tag 12. Nach einem leichten Rückgang steigt die Gesamtdicke bis Tag 17 auf 221%.

In Abbildung 23 wird der Anteil jeder einzelnen Schicht am Gesamtepithel dargestellt. Die Dicke der *Germinativschicht* bleibt an Tag 8 bis 14 geringfügig unter bzw. auf dem Niveau des unbehandelten Epithels. Erst an Tag 15 und 16 ist eine Zunahme auf über 120% festzustellen, die an Tag 17 wieder leicht abfällt. Die *Funktionsschicht* zeigt außer an Tag 8 über den gesamten Beobachtungszeitraum höhere Werte. Die Werte der Keratinschicht bewegen sich zwischen 60-101 µm, d.h. es wird an Tag 17 fast das Sechsfache des Normalwertes erreicht. Demzufolge trägt die Keratinschicht den größten Anteil an der Dickenzunahme.

In einem weiteren Versuchsarm wird der Einfluss der alleinigen Gabe des EGFR-Inhibitors BIBX1382BF bzw. die gemeinsame Applikation mit KGF auf die Epitheldicke bei fraktionierter Bestrahlung mit 5x3Gy/Woche untersucht. Die histologischen Abbildungen 22 verdeutlichen die Veränderungen der Dicke des Epithels nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3Gy. In Abbildung 23 sind die Veränderungen der Dicke des Gesamtepithels der Zungenunterseite im zeitlichen Verlauf bei fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche dargestellt.

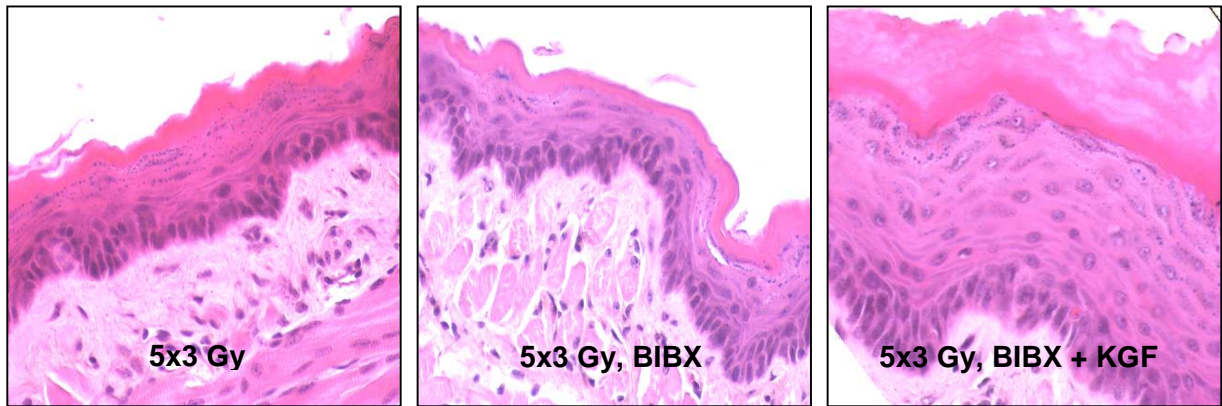


Abb. 22: Histologisches Bild an Tag 7 nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy

Die linke Abbildung zeigt das Epithel nach alleiniger fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy. Im mittleren Bild bei gleicher Vergrößerung ist keine Veränderung der Epitheldicke nach BIBX1382BF-Behandlung sichtbar. Die zusätzliche Gabe von KGF führt zu einer deutlichen Dickenzunahme (rechtes Bild).

Im Einzelnen sind die Werte der Epitheldicke unter sowie nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy und der alleinigen Gabe von BIBX1382BF in Tabelle 25 (Anhang) zusammengefasst.

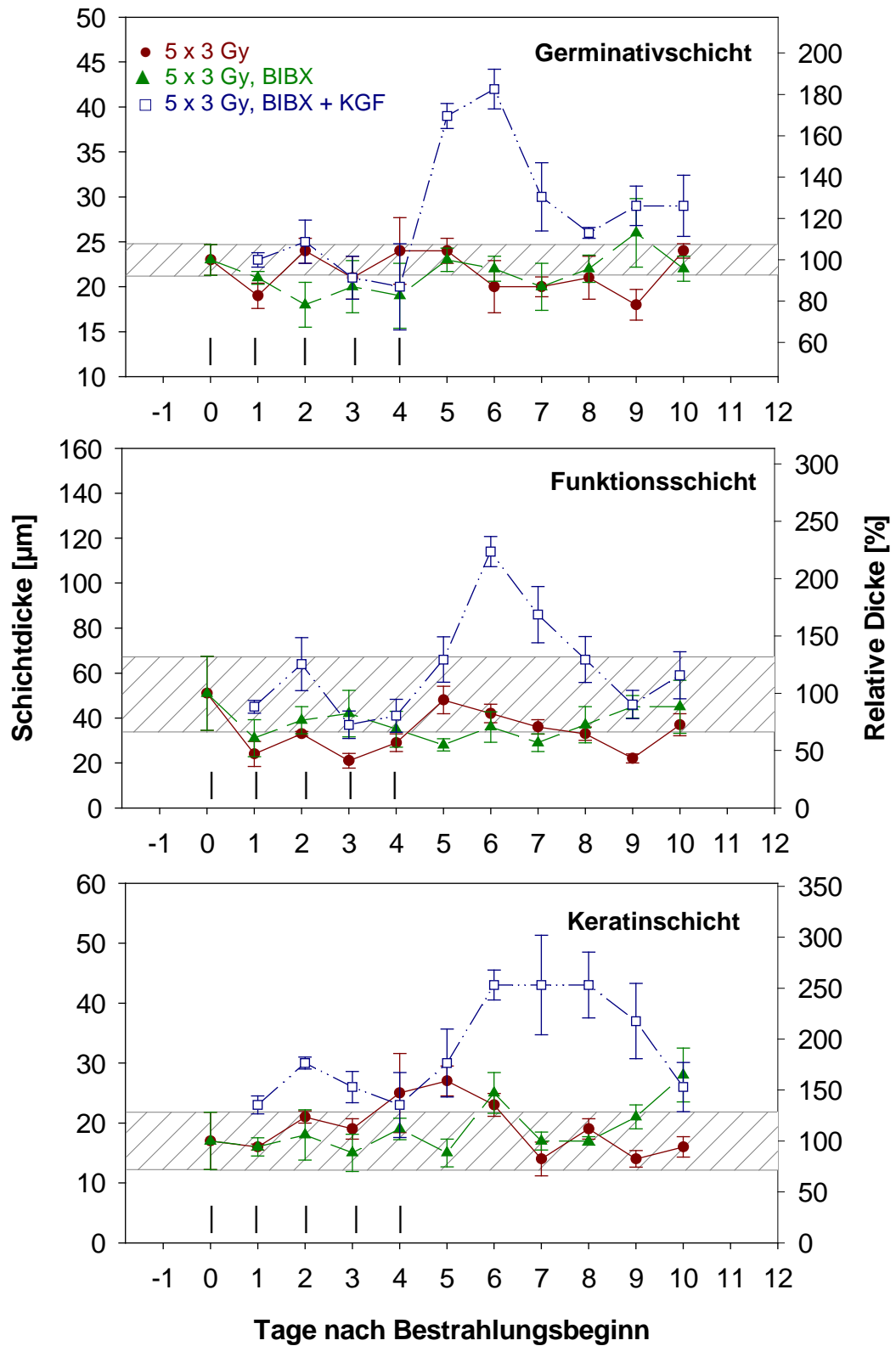


Abb. 23: Dicke der einzelnen Epithelschichten

Die Graphen zeigen die Mittelwerte von je drei Tieren pro Tag. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (SEM) dar. Bei kombinierter Gabe von BIBX1382BF und KGF kommt es am Tag 6 zu einer deutlichen Erhöhung der Dicke aller drei Schichten im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung bzw. zusätzlichen Gabe von BIBX1382BF. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Kontrolle mit Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll (|) mit 5x3 Gy ist oberhalb der Abszisse angegeben.

Die Gabe von *BIBX1382BF* führt zu keinen wesentlichen Veränderungen im Vergleich zum ausschließlich bestrahlten Epithel.

Abbildung 23 zeigt die Veränderung der Epitheldicke unter sowie nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy, der Gabe von BIBX1382BF und KGF. Die Einzelwerte finden sich in Tabelle 26 im Anhang.

Im Vergleich zur alleinigen Gabe von *BIBX1382BF* kann bei der zusätzlichen Gabe von *KGF* schon an den Tagen 1 und 2 ein Anstieg der Epitheldicke auf 131% festgestellt werden. Danach erfolgt ein leichter Rückgang, bis sich nach der KGF-Injektion an Tag +4 die Epitheldicke an Tag 6 verdoppelt. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums sinken die Werte wieder, bleiben aber bis Tag 10 erhöht. *Germinativ-, Funktions- und Keratinschicht* spiegeln den Verlauf des Gesamtepithels wider. Im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit BIBX1382BF, bei der keinerlei nennenswerte Erhöhung der Epitheldicke stattfindet, kann ab Tag 4 in der Germinativ- und ab Tag 5 in den anderen beiden Schichten ein deutlicher Anstieg beobachtet werden. Die Dicke der Germinativschicht bleibt am Ende der Beobachtungszeit deutlich über dem Ausgangsniveau. Die funktionelle Schicht erreicht die Werte des nativen Epithels. Die Dicke der Keratinschicht bleibt bis Tag 10 auf hohem Niveau.

Ein weiterer Teil des Versuchs untersucht den Einfluss der alleinigen Gabe des EGFR-Inhibitors BIBX1382BF bzw. der gemeinsamen Applikation mit KGF auf die Epitheldicke bei fraktionierter Bestrahlung mit 10x3Gy/2 Wochen. Die histologischen Abbildungen 24 veranschaulichen die Veränderungen der Dicke des Epithels bei fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy.

In Abbildung 25 sind die Veränderungen der Dicke des Gesamtepithels der Zungenunterseite im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Einzelwerte unter sowie nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy und der alleinigen Gabe von BIBX1382BF finden sich in Tabelle 27 im Anhang.

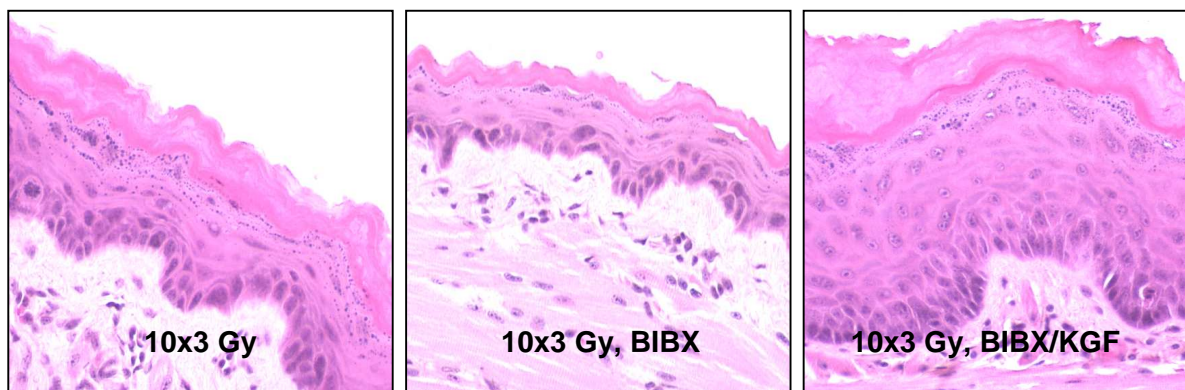


Abb. 24: Histologisches Bild an Tag 13 nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy

Die linke Abbildung zeigt das Epithel nach alleiniger fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy. Im mittleren Bild bei gleicher Vergrößerung ist eine Abnahme der Epitheldicke nach BIBX1382BF-Behandlung sichtbar. Die rechte Abbildung zeigt eine deutliche Dickenzunahme des Epithels nach zusätzlicher Gabe von rHuKGF.

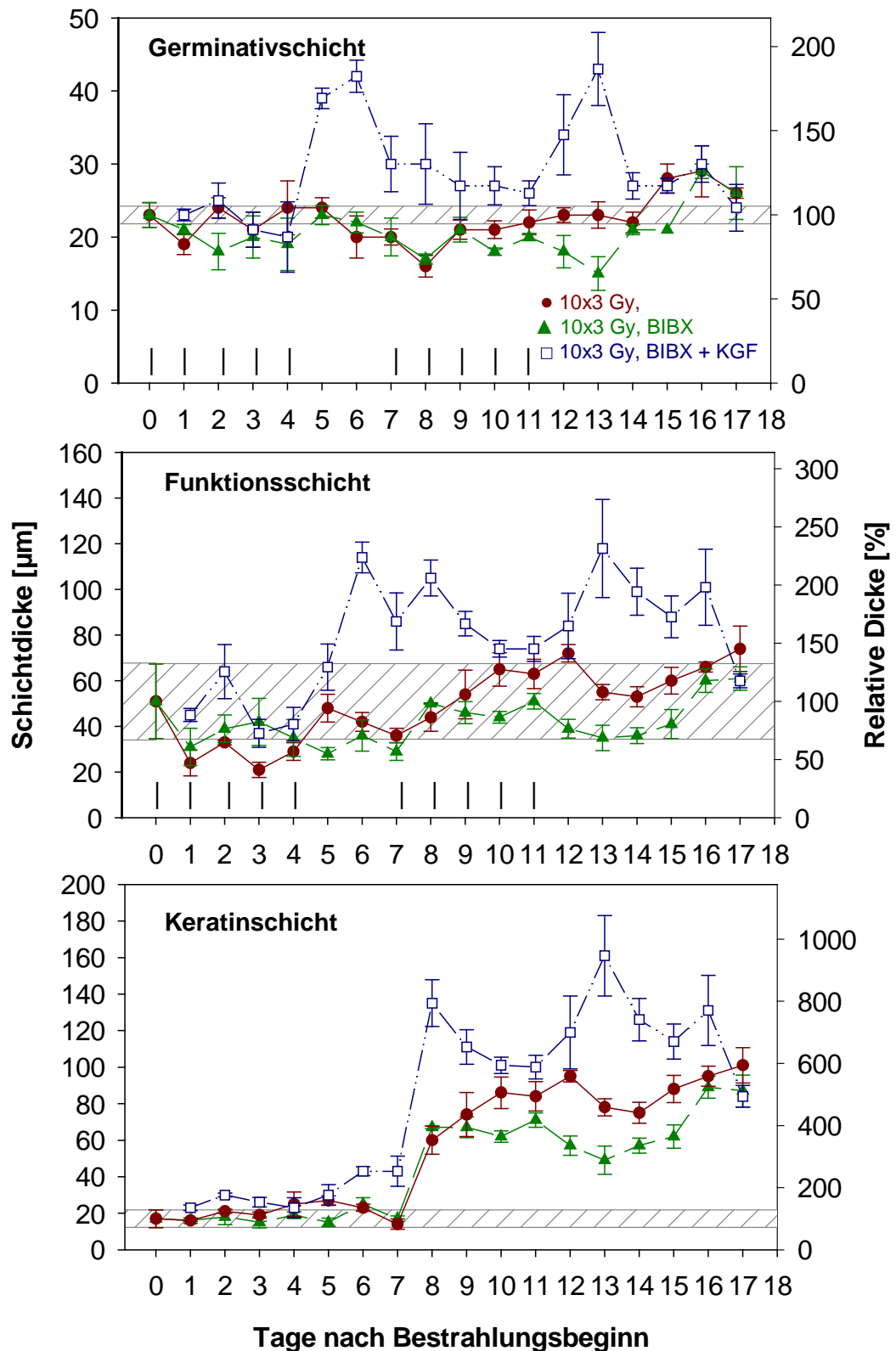


Abb. 25: Dicken der einzelnen Epithelschichten

Die Graphen zeigen die Mittelwerte von je drei Tieren pro Tag. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (SEM) dar. Bei kombinierter Gabe von BIBX1382BF und KGF zeigt sich in allen drei Schichten im Vergleich zu den anderen Versuchsarmen eine deutliche Erhöhung der Dicke. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Kontrolle mit Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll (|) mit 10x3 Gy ist oberhalb der Abszisse angegeben.

Bei der Behandlung mit *BIBX1382BF* ist die anfängliche Zunahme der Epitheldicke im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung deutlich geringer ausgeprägt. Am Ende des Beobachtungszeitraums kann jedoch in beiden Versuchssarmen eine Verdopplung der Epitheldicke festgestellt werden.

Germinativ- und *Funktionsschicht* zeigen wie bei der alleinigen Bestrahlung nahezu unveränderte bzw. geringgradig niedrigere Werte. Nur an den Tagen 16 und 17 können mäßig erhöhte Werte gefunden werden. Im Gegensatz dazu ist die Dicke der *Keratinschicht* über den gesamten Zeitraum sowohl mit als auch ohne *BIBX1382BF* um das 4- bzw. 5-fache erhöht.

Abbildung 25 zeigt im Einzelnen die Werte der Epitheldicke unter sowie nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy, der Gabe von *BIBX1382BF* und *KGF*. Die Einzelwerte finden sich in Tabelle 28 im Anhang.

Die Gabe von *KGF* führt über den gesamten Untersuchungszeitraum zu einer signifikanten Steigerung der Epitheldicke im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung und besonders gegenüber der Gabe von *BIBX1382BF*. Nach der Palifermingabe an Tag 11 wird zwei Tage später der Maximalwert gemessen.

Sowohl die *Germinativ-* als auch die *Funktionsschicht* zeigen fast durchweg Werte über 100%, mit einem Maximum an Tag 13. Im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung bzw. zusätzlichen Gabe von *BIBX1382BF* sind beide Schichten dicker. Ab Tag 14 besitzt die *Germinativschicht* aber vergleichbare Werte. Am Ende der Untersuchungen haben die Schichten wieder Normalwerte erreicht. Den Hauptanteil an der Dickenzunahme trägt die *Keratinschicht*. Mit einer Zunahme über das 6fache während des Beobachtungszeitraums, an Tag 13 sogar bis zum 10fachen, sind die Werte deutlich höher als in den anderen Versuchssarmen. An Tag 17 hat die Dicke der *Keratinschicht* das gleiche Niveau wie bei der alleinigen Bestrahlung bzw. zusätzlichen Gabe von *BIBX1382BF*.

4.5.2.3 Zellvolumen

Die Palifermingabe ruft einerseits eine Zunahme der Zellzahl und andererseits eine Dickenzunahme der germinativen und funktionellen Epithelschichten hervor.

In Abbildung 26 ist das Zellvolumen der *Germinativschicht* im Vergleich der alleinigen fraktionierten Bestrahlung mit der zusätzlichen Gabe von *BIBX1382BF* ohne/mit *KGF* dargestellt. Im Einzelnen sind die Werte des relativen Zellvolumens in Tabelle 29 und 30 (Anhang) zusammengefasst.

Bei der *alleinigen fraktionierten Bestrahlung* mit 5x3 Gy steigt das relative Zellvolumen auf 135% an Tag 2 und bleibt bis zum Tag 6 etwa auf diesem Niveau. An Tag 7 liegen die Zellvolumina wieder im Normalbereich. Bei der zusätzlichen Behandlung mit *BIBX1382BF* verhalten sich die Zellvolumina wie bei der alleinigen Bestrahlung. Durch die kombinierte Behandlung von *BIBX1382BF* und *KGF* steigen die Zellvolumina bis zum Tag 5 stetig an und erreichen Werte von 180%. Ab Tag 8 liegen die Werte wie bei der alleinigen Bestrahlung bzw. zusätzlichen Gabe von *BIBX1382BF* ebenfalls wieder im Normalbereich.

Bei der *alleinigen fraktionierten Bestrahlung* mit 10x3 Gy und auch bei der zusätzlichen Gabe von *BIBX1382BF* liegen die Werte des relativen Zellvolumens von Tag 8 bis 17 alle über den normalen Werten, im Bereich von 110 bis 140%. An Tag 17 haben die Volumina wieder Ausgangswerte erreicht. Die kombinierte Behandlung mit *BIBX1382BF* und *KGF* zeigt von

Tag 8 bis 13 etwas höhere Werte als in den anderen Versuchsarmen, um an Tag 5 und 6 ein Maximum von 166% zu erreichen. An Tag 17 liegen die Werte wieder im Normalbereich. In Abbildung 27 ist das Zellvolumen der Funktionsschicht im Vergleich der alleinigen fraktionierten Bestrahlung mit der zusätzlichen Gabe von BIBX1382BF ohne/mit KGF dargestellt. Im Einzelnen sind die Werte des relativen Zellvolumens in Tabelle 29 und 30 (Anhang) zusammengefasst.

Bei der alleinigen fraktionierten Bestrahlung mit 5x3 Gy fällt das relative Zellvolumen bis Tag 4 auf Werte um 50%. An Tag 5 und 6 liegen die Zellvolumina im Normalbereich. Anschließend sinken sie bis Tag 10 auf 70%. Bei der zusätzlichen Behandlung mit BIBX1382BF sinkt das Zellvolumen an Tag 1 auf 52%. Danach liegen die Werte im subnormalen bis normalen Bereich. Auch bei der kombinierten Behandlung mit BIBX1382BF und KGF zeigt sich an Tag 1 ein Zellvolumen von 60%. Bis Tag 6 erfolgt ein Anstieg auf 143%. An Tag 7 liegen die Werte wieder im Normalbereich.

In der zweiten Bestrahlungswoche findet sich in allen drei Versuchsarmen ein Anstieg des Zellvolumens. Bei der alleinigen fraktionierten Bestrahlung liegt das Zellvolumen an Tag 9 bei 173% und steigt an Tag 12 bis auf 210%. Bis Tag 17 bleiben die Werte bei 150%. Durch die zusätzliche Gabe von BIBX1382BF erfolgt an Tag 8 ein Anstieg auf 174%. Ab Tag 12 liegen die Werte im supranormalen Bereich. Die kombinierte Gabe von BIBX1382BF und KGF führt an Tag 11 zu einem Zellvolumen von 190%. Bis Tag 17 bleiben die Werte wie bei der alleinigen Bestrahlung im Bereich von 150%.

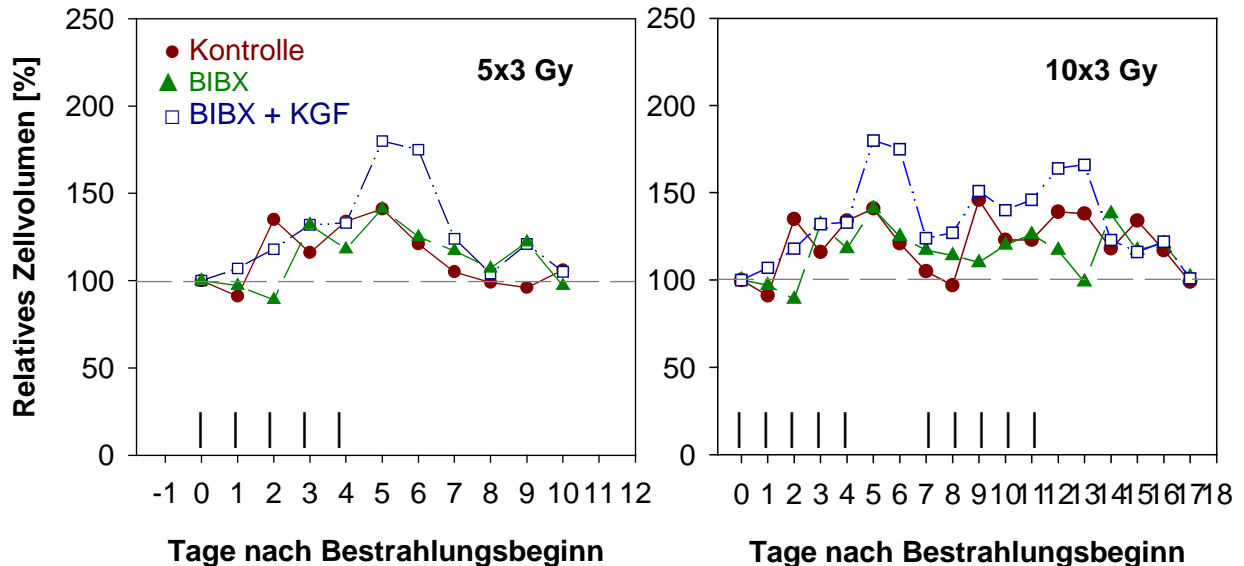


Abb. 26: Relatives Zellvolumen nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy (linke Abb.) und 10x3 Gy (rechte Abb.) in der Germinativschicht

Beide Abbildungen zeigen einen im Vergleich zur Bestrahlung mit oder ohne BIBX1382BF Anstieg des Zellvolumens nach Palifermingabe. In der linken Abbildung (5x3 Gy) findet sich eine deutliche Zunahme von Tag 4-6. Bei der Behandlung mit 10x3 Gy (rechte Abb.) auch von Tag 11-13. Das Bestrahlungsprotokoll (|) mit 5x3 Gy bzw. 10x3 Gy ist oberhalb der Abszisse angegeben.

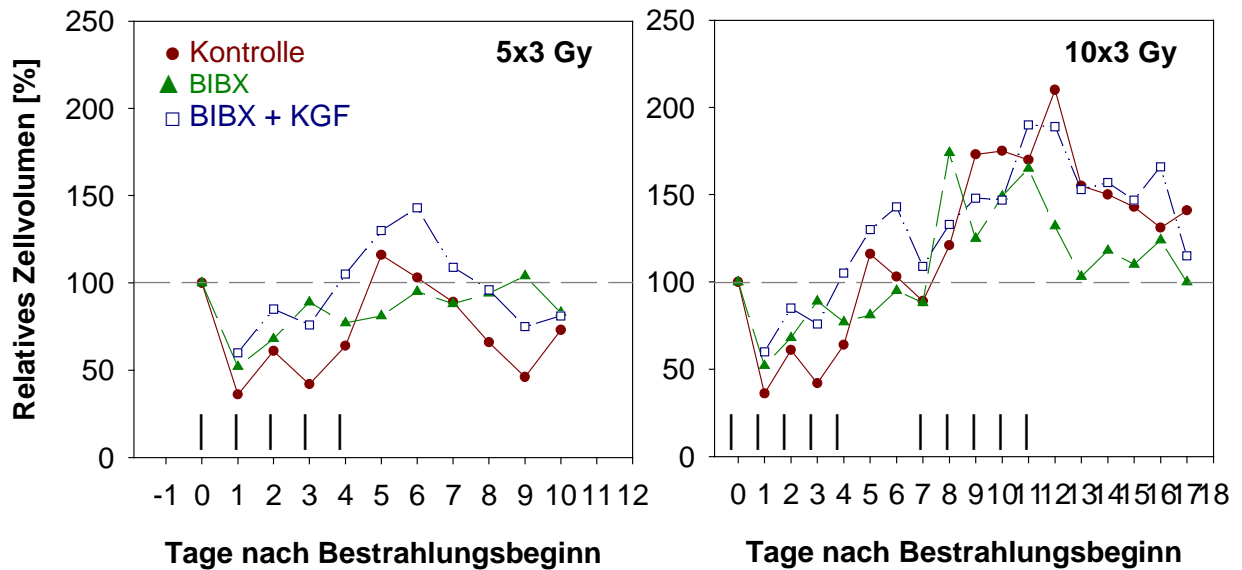


Abb. 27: Relatives Zellvolumen nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy (linke Abb.) und 10x3 Gy (rechte Abb.) in der Funktionsschicht

In der linken Abbildung (5x3 Gy) ist bis Tag 4 in allen Versuchsarmen ein deutlicher Rückgang des Zellvolumens zu beobachten. Nach Palifermingabe an Tag 4 kommt es bis zum Tag 6 zu einem Anstieg. Die rechte Abbildung (10x3 Gy) zeigt eine deutliche Zunahme des Zellvolumens während der zweiten Bestrahlungswoche. Das Bestrahlungsprotokoll (|) mit 5x3 Gy bzw. 10x3 Gy ist oberhalb der Abszisse angegeben.

4.6 Proliferationsuntersuchungen

Zur Untersuchung der Wirkung von BIBX1382BF ohne/mit KGF auf die Proliferation wird die Zahl an Ki-67 positiven Zellen nach immunhistochemischer Färbung mit dem Antikörper TEC-3 bestimmt (Abb. 28).

Daneben erfolgt die Zählung der Mitosefiguren in den HE-gefärbten Präparaten.

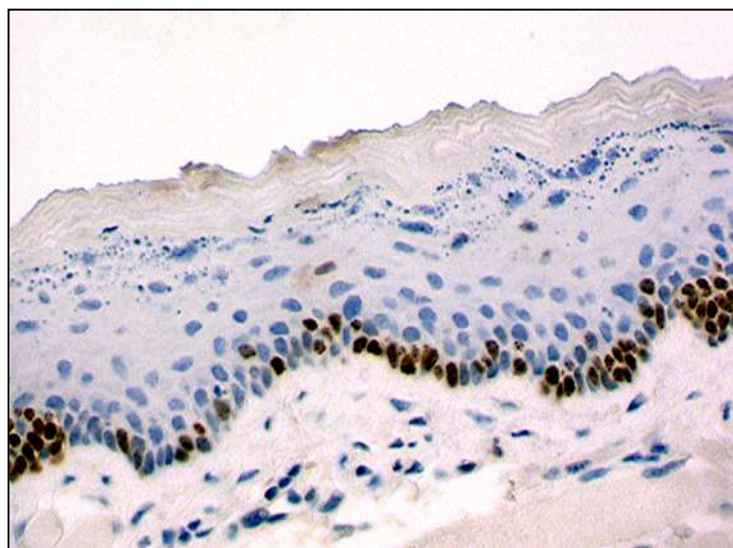


Abb. 28: Ki-67 positive Zellen bei der immunhistochemischen Darstellung mit TEC-3

Die Färbung erfolgt nach der Avidin-Biotin-Methode mit dem spezifischen Antikörper TEC-3 gegen das Antigen Ki-67. Die positiv braun gefärbten Zellen markieren die aktiv proliferierenden Zellen (späte G1-, S- und G2-Phase).

4.6.1 Bestrahlung mit 5x3 Gy über 1 Woche

Bei der Entnahme der Zungen um 10.00 Uhr werden im unbestrahlten Epithel $0,5 \pm 0,1$ Mitosefiguren pro Millimeter Epithellänge sowie 139 ± 49 Ki-67-positive Zellen pro mm Epithellänge gefunden (siehe Kap. 4.5.1).

Die Zahl der Ki-67 positiven Zellen während des Untersuchungszeitraums bei fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche ist in Abbildung 29 dargestellt.

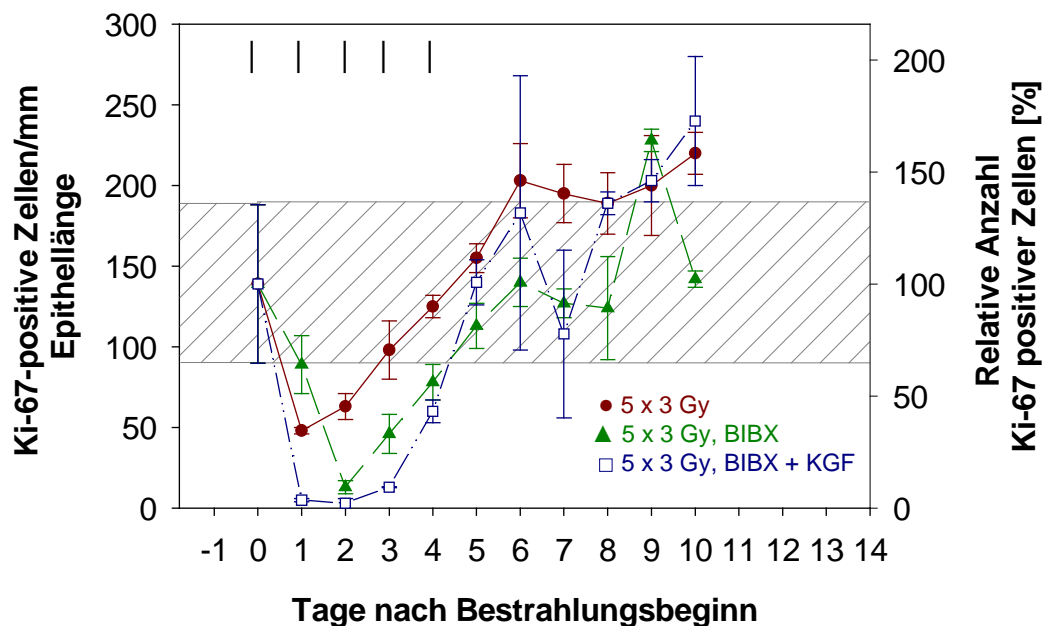


Abb. 29: Zahl der Ki-67 positiven Zellen

Die Abbildung illustriert die Veränderungen der Zahl der Ki-67 positiven Zellen während und nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy. Die Fehlerbalken stehen für den Standardfehler (SEM). Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Werte der Kontrolle \pm Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll (|) mit 5x3 Gy ist am oberen Rand der Abbildung angegeben.

Bei *alleiniger fraktionierter Bestrahlung* mit einer Dosis von 5x3 Gy kommt es zu einer starken Reduktion der Ki-67 positiven Zellen an den ersten beiden Tagen auf 35%. Danach erholt sich die Anzahl langsam wieder und entspricht von Tag 3-9 dem Kontrollwert. An Tag 10 kann im Vergleich zum unbestrahlten Epithel eine deutliche Steigerung der Anzahl bis auf 220 Zellen pro mm Epithellänge, dass entspricht 158% des Kontrollwertes, gefunden werden.

Die zusätzliche Gabe von *BIBX1382BF* führt im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung zu einer deutlich stärkeren Reduktion der Ki-67 positiven Zellen auf 9% (13/mm) an Tag 2. An Tag 5 wird das Ausgangsniveau wieder erreicht. Bei der kombinierten Gabe von *BIBX1382BF* und *KGF* erfolgt ein fast vollständiger Rückgang der Zellzahl von Tag 1-3 mit einem Minimum von 3 Zellen/mm Epithellänge (2%) an Tag 2.

Die Mitosezahlen während des Untersuchungszeitraums bei fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche sind in Abbildung 30 dargestellt.

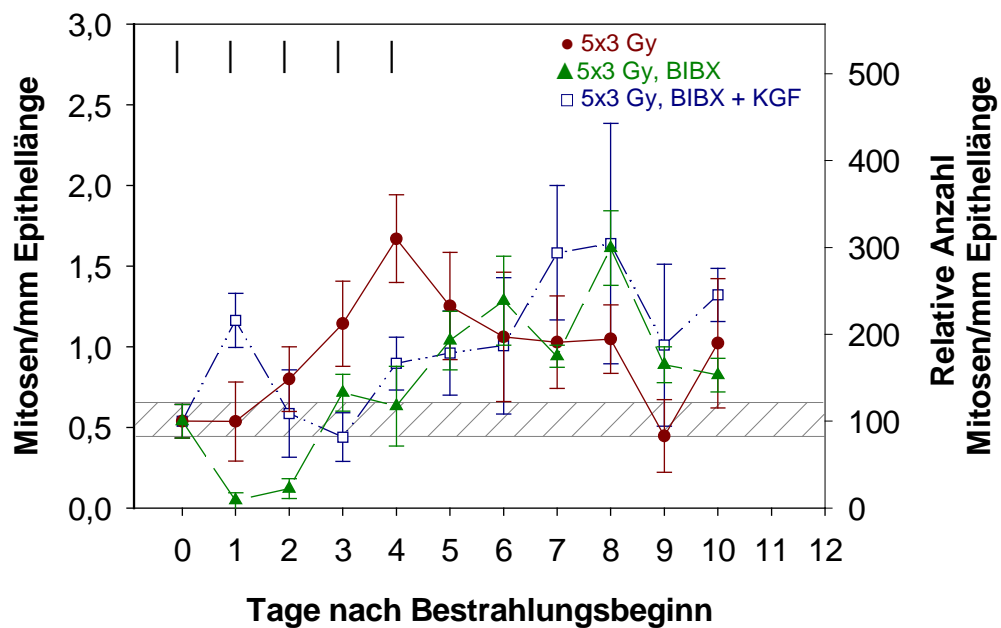


Abb. 30: Zahl der Mitosen

Die Abbildung illustriert die Veränderungen der Zahl der Mitosefiguren bei fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy. Die Fehlerbalken stehen für den Standardfehler (SEM). Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Kontrolle mit Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll (|) mit 5x3 Gy ist am oberen Rand der Abbildung angegeben.

Bei *alleiniger fraktionierter Bestrahlung* mit einer Dosis von 5x3 Gy steigt die Zahl der Mitosen unter Bestrahlung bis zum Tag 4 auf 1,5-2 Mitosen/mm Epithellänge an. Bis zum Tag 10 kann durchschnittlich 1 Mitose/mm Epithellänge gezählt werden, im Vergleich zum unbehandelten Epithel mit $0,5 \pm 0,1$ Mitosen/mm.

Bei zusätzlicher Gabe von *BIBX1382BF* sinkt die Mitosezahl im Gegensatz zur alleinigen Bestrahlung an den Tagen 1 und 2 fast auf 0. Bis zum Tag 4 steigt sie wieder auf etwa 0,5 Mitosen/mm. Bis zum Tag 10 kann wie bei der alleinigen Bestrahlung 1 Mitose/mm Epithellänge pro Tag gefunden werden.

Auch die kombinierte Gabe von *BIBX1382BF* und *KGF* führt zu keiner wesentlichen Erhöhung der Mitosezahl. Bis zum Tag 4 bleibt die Anzahl eher auf Ausgangsniveau bis dann im Gegensatz zu den anderen Versuchen die Zahl der Mitosen/mm Epithellänge an den Tagen 7 und 8 bis auf 1,5-2 Mitosen ansteigt. Der Anstieg erfolgt 3 Tage nach KGF-Applikation.

4.6.2 Bestrahlung mit 10x3 Gy über 2 Wochen

Die Zahl der Ki-67 positiven Zellen während des Untersuchungszeitraums bei fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy/2 Wochen ist in Abbildung 31 dargestellt.

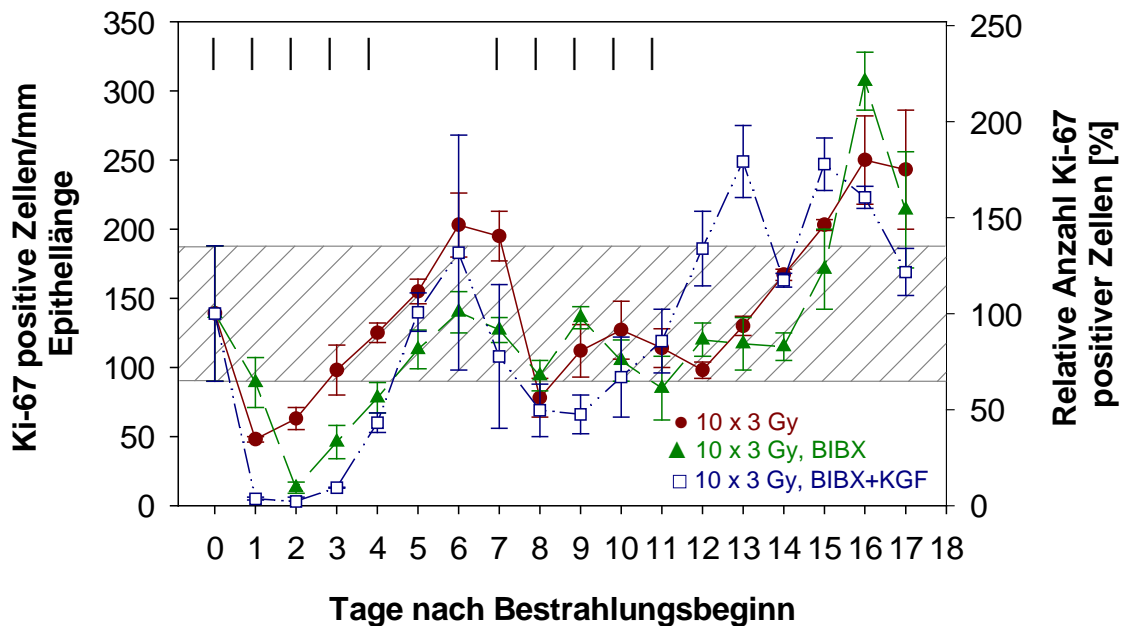


Abb. 31: Zahl der Ki-67 positiven Zellen

Die Abbildung illustriert die Veränderungen der Zahl der Ki-67 positiven Zellen während und nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy. Die Fehlerbalken stehen für den Standardfehler (SEM). Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Werte der Kontrolle \pm Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll (|) mit 10x3 Gy ist am oberen Rand der Abbildung angegeben.

Bei *alleiniger fraktionierter Bestrahlung* mit 10x3 Gy werden in der 2. Woche der Bestrahlung subnormale bis normale Werte gefunden. Im Anschluss zeigt sich im Vergleich zum unbestrahlten Epithel eine deutliche Steigerung der Anzahl bis auf 250 positive Zellen/mm Epithellänge an Tag 16, was einer relativen Anzahl von 180% entspricht. Auch an Tag 17 ist diese Erhöhung der Zellzahl noch vorhanden.

Die Gabe von *BIBX1382BF* verändert das Verhalten der Zellzahl gegenüber der alleinigen Bestrahlung in der zweiten Woche nur unwesentlich. Auch hier erfolgt an Tag 8 ein geringer Rückgang der Ki-67 positiven Zellen auf 68% (94/mm), gefolgt von subnormalen bis normalen Werten bis Tag 15. An Tag 16 zeigt sich ein Maximalwert von 307 Zellen/mm (221%). Am letzten Tag sinkt die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen wieder auf 214 Zellen/mm (154%), was aber noch über dem Wert des unbehandelten Epithels liegt.

Bei der kombinierten Gabe von *BIBX1382BF* und *KGF* erfolgt der Anstieg der Anzahl positiv gefärbter Zellen deutlich früher. Dem Rückgang der Anzahl auf die Hälfte (47%) der Zellzahl des nativen Epithels bis zum Tag 9 folgt ein schneller Anstieg bis zum Tag 12 auf 134% (186 Zellen/mm). Bei diesem Experiment zeigen sich zwei Maxima mit etwa gleicher Anzahl Ki-67 positiver Zellen, an Tag 13 und 15 mit ca. 249 Zellen/mm (179%). Bis zum Tag 17 sinken die Werte wieder auf Ausgangsniveau.

Die Mitosezahlen während des Untersuchungszeitraums bei fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy/2 Wochen sind in Abbildung 32 dargestellt.

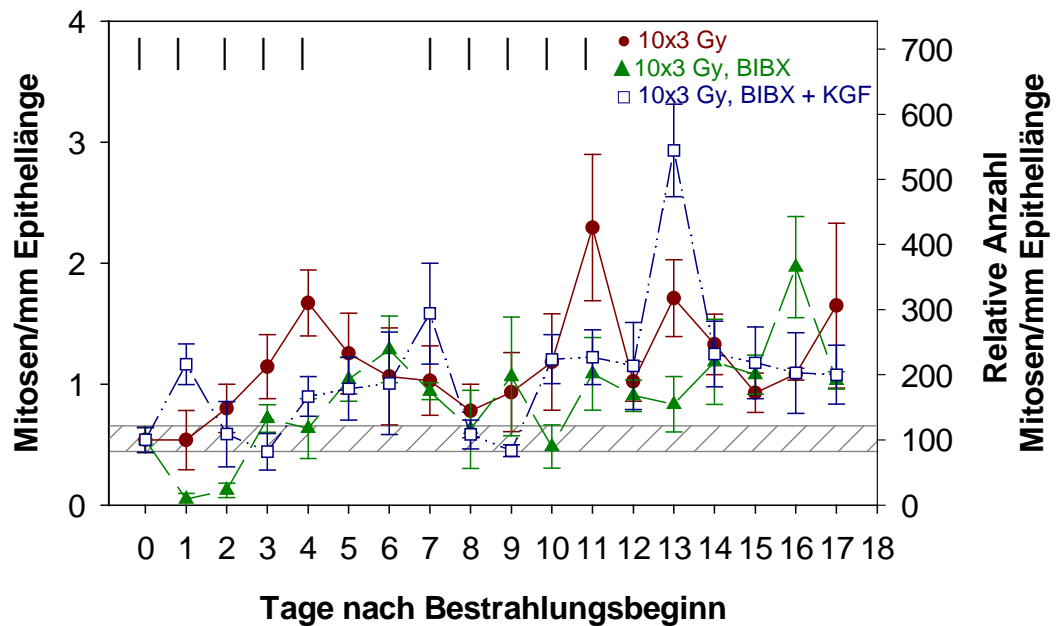


Abb. 32: Zahl der Mitosen

Die Abbildung illustriert die Veränderungen der Zahl der Mitosefiguren bei fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy. Die Fehlerbalken stehen für den Standardfehler (SEM). Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Kontrolle mit Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll (|) mit 10x3 Gy ist am oberen Rand der Abbildung angegeben.

Die Mitosezahl unter alleiniger fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy unterliegt ausgeprägten Schwankungen. Generell liegt sie mit mindestens 1 Mitose/mm Epithellänge über der Zahl des unbehandelten Epithels. An den Tagen 11, 13 und 17 sind 1,5-2 Mitosen/mm Epithellänge vorhanden.

Die zusätzliche Gabe von *BIBX1382BF* führt zu geringeren Schwankungen der Mitosezahl im Vergleich zur alleinigen fraktionierten Bestrahlung. Außer an den Tagen 8 und 10 mit 0,5 Mitosen/mm, entsprechend dem unbehandelten Epithel, kann 1 Mitose/mm Epithellänge gefunden werden. Nur an Tag 16 sind 2 Mitosen/mm vorhanden.

Bei der gemeinsamen Gabe von *BIBX1382BF* und *KGF* ist an Tag 13, 2 Tage nach KGF-Applikation, der Anstieg auf knapp 3 Mitosen/mm Epithellänge auffällig. Am Anfang der zweiten Bestrahlungswoche können 0,5 Mitosen/mm wie im unbehandelten Epithel gezählt werden. Ansonsten findet sich 1 Mitose/mm von Tag 10-17 wie bei der alleinigen Gabe von *BIBX1382BF*.

5 Diskussion

5.1 Klinischer Hintergrund

Die Inzidenz von oralen Tumoren beim Hund und bei der Katze wird mit 70,4 bzw. 45,4 pro 100.000 Tiere angegeben (KESSLER 2005). Bei diesen Tierarten zählen Krebserkrankungen zu den Haupt-Todesursachen (EICHEMBERG u. SEINE 1996). Im Jahr 2004 beträgt beim Menschen die Zahl der Neuerkrankungen an bösartigen Veränderungen im Bereich der Mundhöhle und des Rachens über 10.000 (GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND 2008). Die Tumorerkrankungen stellen beim Menschen nach den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen dar (Achterberg et al. 2006).

Die Therapiemöglichkeiten von Kopf-Hals-Tumoren umfassen - neben der chirurgischen und chemotherapeutischen Behandlung - auch die Bestrahlung, als sehr effektive Behandlungsform. In der Humanmedizin erhalten mehr als 50% der Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung eine Strahlentherapie. Das Zielvolumen einer kurativen Strahlentherapie umfaßt grundsätzlich einen beträchtlichen Anteil gesunden Normalgewebes. Dies betrifft gesunde Strukturen innerhalb des Tumors (z.B. Gefäße, verbleibendes Organparenchym), Gewebe in unmittelbarer Umgebung des klinisch diagnostizierbaren Tumors, in denen eine Infiltration erwartet werden muss, aber auch Gewebe und Organe in den Ein- und Austrittskanälen der Strahlung. Somit muss eine erfolgsversprechende kurative Radiotherapie immer mit einer Exposition eines nicht unbeträchtlichen Anteils von Normalgeweben mit signifikanten Dosen einhergehen. Als Folge dieser Strahlenexposition können frühe und chronische Nebenwirkungen ausgelöst werden (DÖRR et al. 2005).

Eine der bedeutendsten frühen Nebenwirkungen im Kopf-Hals-Bereich ist die radiogene Mukositis in der Mundhöhle. Nach der Applikation einer Gesamtdosis von 20 Gy kommt es nach etwa neun Tagen zur Ausbildung einer ulzerativen radiogenen Mukositis, die oft dosislimitierend ist (DÖRR 2003a, DÖRR et al. 2007, HERRMANN et al. 2006). Die schmerzhafte Symptomatik ist häufig ein Grund für die Unterbrechung der Therapie für 2 bis 4 Wochen. Die frühe Schleimhautreaktion kann bei der Strahlentherapie in bis zu 86% der Fälle der Grund für eine Behandlungspause sein (HERRMANN et al. 1994). Da vor allem bei Kopf-Hals-Tumoren mit zunehmender Gesamtbehandlungszeit die Strahlentoleranz deutlich zunimmt, kommt es durch Behandlungsunterbrechungen zu einer signifikanten Verschlechterung der Heilungsaussichten (FOWLER u. LINDSTRÖM 1992, FU et al. 2000, OVERGAARD et al. 2003, SCHMIDT-ULLRICH u. MORRIS 2001). Der Grund dafür sind die in den Therapiepausen ungestört ablaufenden Proliferationsprozesse der klonogenen Tumorzellen (SCHMIDT-ULLRICH u. MORRIS 2001). Ein weiterer Aspekt der frühen Mukositis ist die Ausbildung von konsekutiven Spätfolgen in Abhängigkeit von Dauer und Schweregrad der Frühreaktion (DÖRR u. HENDRY 2001). In einer Studie von MACIEJEWSKI et al. (1990) werden 498 Patienten mit einer frühen Strahlenreaktion der Mundschleimhaut und 268 Patienten ohne eine ausgeprägte Mukositis 18 Monate nach der Strahlentherapie untersucht. Das Auftreten von späten Strahlenreaktionen korreliert signifikant mit dem Schweregrad der Frühreaktionen.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt sind die hohen Kosten der Strahlenfolgen an der Mundschleimhaut. Kostenabschätzungen aus den USA, die in ihrer Größenordnung auch auf das deutsche Gesundheitssystem übertragen werden können, gehen von mehreren tausend Eu-

ro zusätzlicher Kosten pro Patient infolge der Schleimhautreaktion aus (DÖRR et al. 2008, ELTING et al. 2007).

Aufgrund dieser klinischen Bedeutung der Mukositis ist es notwendig, Strategien zu entwickeln, um die frühe Schleimhautreaktion gezielt zu vermindern und so eine bessere Therapieverträglichkeit für den Patienten zu erreichen. Des Weiteren sollten lange Behandlungspausen verhindert, die Spätfolgen reduziert und zusätzliche Therapiekosten vermieden werden. So könnte der therapeutische Erfolg einer Strahlenbehandlung in der Humanmedizin verbessert werden (DÖRR et al. 2007). Gleiches gilt perspektivisch auch für die Tiermedizin. Besitzer von krebserkrankten Hunden und Katzen sind oft aus der Presse und aus eigener Erfahrung gut informiert über die Behandlungsmöglichkeiten in der Humanmedizin. Dies führt dazu, dass immer mehr Tierbesitzer sich nach Möglichkeiten zur optimalen Behandlung, einschließlich einer Bestrahlung, ihres Tieres erkundigen und sich auch dazu entschließen. Das ist der Grund dafür, dass in den letzten Jahren die Strahlentherapie als therapeutische Option in der Veterinärmedizin zunehmend nachgefragt wird. Mittlerweile bieten immer mehr Universitäten und private Kliniken eine Strahlentherapie an (KANDEL 2004, KASER-HOTZ 2001, 2005, NIEMAND u. SUTER 2001).

Prinzipiell sind auch in der Veterinärmedizin kurative und palliative Bestrahlungsprotokolle zu unterscheiden. Ein gängiges Protokoll in der Veterinärmedizin besteht in 10-12 Fraktionen von 4 Gy nach einem Montag Mittwoch Freitag-Schema. Bei der Applikation von höheren Dosen nach diesem Schema treten verstärkt Nebenwirkungen auf. Demzufolge wird versucht, Protokolle mit täglicher Bestrahlung, wie z.B. 15 mal 3,3 Gy in drei Wochen mit einer Gesamtdosis von 49,5 Gy zu applizieren. Dies ist wiederum mit einer Belastung durch tägliche Narkosen und deutlich höheren Kosten verbunden (KASER-HOTZ 2001). Durch die aggressiver werdenden Bestrahlungsprotokolle spielen die frühen und chronischen Nebenwirkungen und deren supportive Maßnahmen auch in der Veterinärmedizin eine immer größere Rolle. Dabei können Erkenntnisse über supportive Maßnahmen bei Nebenwirkungen in der Radio(chemo)therapie beim Menschen häufig in die Veterinärmedizin übertragen werden.

Die Mukositis im Kopf-Hals-Bereich beginnt unter täglicher Bestrahlung in der 2. Behandlungswoche und verschlimmert sich innerhalb von 1-2 Wochen bis hin zur konfluenten ulzerativen Form (siehe Kap. 2.5.1). Konsequenzen, wie Schmerzen, Schluckbeschwerden, Verweigerung der Nahrungsaufnahme und dadurch Verlust von Körpergewicht, treten je nach Schweregrad der Läsionen auf. Erst einige Wochen nach Ende der Strahlentherapie sind die frühen Nebenwirkungen abgeheilt (GRIER u. MAYER 2007).

Die enorme klinische Bedeutung der oralen Mukositis bedingt die Notwendigkeit, diese Nebenwirkung im klinischen Alltag möglichst weit zu reduzieren. Von Seiten der Bestrahlungsplanung ist auf eine Minimierung des bestrahlten Schleimhautvolumens zu achten. Beim Vorliegen metallhaltiger Zahnimplantate, die mit einer massiven lokalen Dosiserhöhung in Folge der Streustrahlung einhergehen, muss der Abstand der Schleimhaut durch sogenannte Retraktor-Zahnschienen gewährleistet werden. Von Seiten des Patienten bzw. der Patientenbetreuung ist auf eine optimale Mundhygiene zu achten, in Verbindung mit möglichst häufigen Mundspülungen. Dabei steht der Spülvorgang selbst im Vordergrund, die Spüllösung ist von untergeordneter Bedeutung (DÖRR et al. 2008). Daneben gelten symptomatische Maßnahmen, wie eine ausreichende und angemessene Schmerzmedikation sowie die antibiotische Versorgung als anerkannt. Trotz einer Vielzahl experimenteller und

klinischer Untersuchungen mit durchaus viel versprechenden Ergebnissen hat jedoch bisher keine gezielte mukoprotektive Strategie Eingang in die klinische Routine gefunden (DÖRR et al. 2007, 2008).

Einen neuen, viel versprechenden Ansatz stellt die Verwendung von Wachstumsfaktoren wie dem rekombinanten humanen Keratinozyten-Wachstumsfaktor (rHuKGF, Palifermin) dar (DÖRR 2003a, DÖRR et al. 2007, FINCH u. RUBIN 2006). Keratinozyten-Wachstumsfaktor bewirkt eine Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen. Durch den Einsatz von rHuKGF kann in präklinischen Untersuchungen eine signifikante Reduktion der Schleimhautreaktion nach Einzeit- und nach fraktionierter Bestrahlung sowie nach Radiochemotherapie nachgewiesen werden (DÖRR 2003a, DÖRR et al. 2001, 2002a). Somit stellt rHuKGF ein viel versprechendes Mittel für den Einsatz zur Verminderung der Mukositis dar. In klinischen Studien zur Reduktion der Mukositis bei der Konditionierungsbehandlung vor Stammzelltransplantation ist die Wirksamkeit bereits nachgewiesen worden (SPIELBERGER et al. 2004). Vergleichbar positive Daten liegen für eine Phase III-Studie bei der postoperativen Radiochemotherapie fortgeschrittener Kopf-Hals-Tumoren vor (HENKE et al. 2008).

Der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und sein Rezeptor (EGFR) sind beteiligt an der Regulation von regenerativen und Strahlenresistenz-steigernden Prozessen in Tumoren während fraktionierter Radiotherapie. EGFR ist in einer Vielzahl von Tumoren konstitutiv überexprimiert. Aus diesem Grund werden nach dem positiven Verlauf klinischer Studien (CAPONIGRO 2004, HARARI u. HUANG 2004, MILAS et al. 2000) verschiedene EGFR-Inhibitoren zur Verbesserung des Erfolgs der Radiotherapie eingesetzt. Dazu zählen Rezeptor-Antikörper wie Cetuximab und Panitumumab und auch Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Gefitinib, Erlotinib und Lapatinib.

Immunhistochemische Studien zeigen einen Anstieg der EGF- und EGFR-Expression in der murinen Mundschleimhaut während fraktionierter Bestrahlung (DÖRR 2000, DÖRR et al. 2007a, KASE 2001). Somit besteht die Möglichkeit, dass das EGF/EGFR-System in die Regulation von Regenerationsvorgängen in diesem Normalgewebe einbezogen ist. Der Einfluss einer Inhibition des EGFR mittels des spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitors BIBX1382BF wird in der vorliegenden Studie an der Zungenschleimhaut der Maus dargestellt. Weiterhin wird eine mögliche Interaktion der EGFR-Blockade mit der mukoprotektiven Wirkung von rHuKGF untersucht.

5.2 Funktionelle Untersuchungen

Ein geeignetes und anerkanntes tierexperimentelles Modell zur Untersuchung der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ist die Zungenunterseite der Maus (DÖRR 1987). Die zellkinetischen Parameter, das Proliferationsverhalten und die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut von Mensch und Maus sind im Wesentlichen vergleichbar (DÖRR et al. 1994a). Die Strahlenantwort wird durch die gleichen intra-, interzellulären und parakrinen Einflüsse bestimmt. Demzufolge scheint eine *qualitative* Übertragung der tierexperimentellen Ergebnisse auf die klinische Situation beim Menschen und auch auf den Patienten in der Veterinärmedizin möglich und gerechtfertigt. Jedoch muss bedacht werden, dass eine *quantitative* Übertragung experimenteller Daten nur eingeschränkt möglich ist. Diese Übertragung bedarf einer entsprechenden Absicherung durch klinische Ergebnisse (DÖRR 1997a).

Die Beurteilung der Strahlenreaktion ist subjektiv. Dies gilt für den Patienten in der Human- und Veterinärmedizin ebenso wie für das experimentelle System. NICKSTADT (2000) vergleicht die Ergebnisse verschiedener Untersucher am Modell der Mäusezunge (Stamm C3H/Neu) von 1995 bis 1999. Die Ulkusinzidenz, welche die Grundlage für Dosis-Effekt-Analysen bildet, ist dabei ein relativ robuster Parameter, der kaum individuellen Einflüssen unterliegt. So bleiben die ED₅₀-Werte aus verschiedenen Untersuchungen in einem sehr engen Bereich von 10-12 Gy. Demgegenüber zeigen die zeitlichen Verlaufsparemeter, Latenzzeit und Ulkusdauer, etwas größere Schwankungen zwischen den Untersuchern. Diese Analyse wird durch die Beobachtungen aus den letzten Jahren bestätigt (DÖRR pers. Mitteilung). Um den Einfluß der Beurteilung durch verschiedene Untersucher zu vermeiden, werden in der vorliegenden Arbeit alle Mukositis-Beurteilungen durch die Autorin selbst vorgenommen.

Zur Definition der Strahlenreaktion der Zungenschleimhaut wird eine Einzeitbestrahlung als Kontrollversuch durchgeführt. Die zu bestimmenden Parameter sind die Dosisabhängigkeit in Form des ED₅₀-Wertes (Dosis, bei der bei 50% der Tiere ein Ulkus zu erwarten ist), die Latenzzeit und die Ulkusdauer. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen bestätigen, dass die relative Ulkushäufigkeit eine signifikante Dosisabhängigkeit ($p=0,0004$) aufweist. Die gemeinsame Analyse der beiden durchgeführten Einzeitbestrahlungen ergibt eine ED₅₀ von $11,9 \pm 1,4$ Gy. Dies stimmt mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen an diesem Tiermodell überein.

Die Ulzeration besteht für durchschnittlich $2,8 \pm 0,7$ Tage und ist im verwendeten Dosisbereich unabhängig von der Strahlendosis. Andere Untersuchungsergebnisse zeigen ähnliche Werte zwischen 2 bis 4 Tagen (z.B. DÖRR et al. 2005d, KLAMMT 2005, NICKSTADT 2000). In der vorliegenden Arbeit beträgt die mittlere Latenzzeit bei Einzeitbestrahlung $9,2 \pm 0,7$ Tage. Frühere Untersuchungen ergeben ebenfalls Latenzzeiten zwischen 9 und 12 Tagen (z.B. DÖRR 1997a, DÖRR et al. 2005d, KLAMMT 2005, NICKSTADT 2000).

Geschlechtsunterschiede auf die Strahlenempfindlichkeit oder den Verlauf der Schleimhautreaktion sind nicht bekannt (DÖRR u. OBEYESEKERE 2001), weshalb beide Geschlechter für die Studien genutzt werden können.

5.3 Strahlenreaktion nach fraktionierter Bestrahlung - Ulkusinzidenz und zeitlicher Verlauf

Die Ulkusinzidenzen der alleinigen fraktionierten Bestrahlung mit 5x3 Gy (ED₅₀ – für die Testbestrahlung $6,7 \pm 2,1$ Gy) und 10x3 Gy (ED₅₀ – für die Testbestrahlung $6,5 \pm 1,9$ Gy) entsprechen den Werten aus vergleichbaren Untersuchungen am gleichen Tiermodell (z.B. DÖRR et al. 2002a, GEHRISCH u. DÖRR 2007, DÖRR et al. 2005d). Gegenüber der Einzeitbestrahlung besteht nach 5x3 Gy/1 Woche eine signifikante Linksverschiebung der Dosis-Effekt-Kurven für die abschließende Testbestrahlung. Diese spiegelt den Effekt der fraktionierten Dosis an der Schleimhaut wider. Zwischen der fraktionierten Bestrahlung über eine Woche und über zwei Wochen bestehen jedoch keine signifikanten Unterschiede in den isoeffektiven Testdosen, trotz der zusätzlichen Wochendosis von 5x3 Gy in der zweiten Woche. Dies ist auf die effektiven Repopulierungsvorgänge (siehe Kap. 2.8.3) zurückzuführen, die in früheren Untersuchungen bereits eingehend quantifiziert werden (DÖRR 1997a, 2003b).

Die Latenzzeit zur Ulkuszestehung nach fraktionierter Bestrahlung, bezogen auf den Tag der Testbestrahlung, ist im Vergleich zur Einzeitbestrahlung ($9,2 \pm 0,7$ Tage) verkürzt. Schon bei der Bestrahlung mit 5×3 Gy/Woche verringert sich die Latenzzeit auf $9,0 \pm 1,1$ Tage nach Top-up, bei der Fraktionierung mit 10×3 Gy/Woche auf $6,0 \pm 0,8$ Tage nach Top-up. Grund dafür ist der bereits während der fraktionierten Bestrahlung, d.h. vor der Top-up-Bestrahlung beginnende Zellverlust. Nach der Top-up-Bestrahlung wird somit weniger Zeit bis zum kompletten Verlust der Zellen benötigt.

5.4 Einfluss der EGFR-Blockade durch BIBX1382BF auf die Ausprägung der radiogenen Mukositis

Vom EGFR werden mittlere Werte in den proliferativen Schichten des Kontrollepithels gefunden. Nach Einzeitbestrahlung mit 8 und 15 Gy findet DÖRR (2000) einen Anstieg des EGFR in der proliferativen Schicht zwischen Tag 2 und 6. Zusätzlich zeigt sich eine gering ausgeprägte Veränderung in den sonst EGFR-negativen funktionellen Schichten. In den ersten Tagen nach Einzeitbestrahlung mit 15 Gy findet dagegen KASE (2001) keine signifikante Veränderung, sondern erst im späteren Verlauf. Der Widerspruch kommt durch die fluktuierenden Werte, die in unbestrahltem Epithel beobachtet werden, zustande (KASE 2001).

In immunhistochemischen Studien an der murinen Mundschleimhaut wird ein Anstieg der EGFR-Expression unter fraktionierter Bestrahlung festgestellt (DÖRR 2000, KASE 2001), ohne dass deren Bedeutung für die Manifestation der oralen Mukositis geklärt ist. In der vorliegenden Studie soll deshalb untersucht werden, ob eine Blockade des EGFR mittels BIBX1382BF zu einer Modifikation der radiogenen Mucositis enoralis führt. BIBX1382BF ist ein selektiver Inhibitor des EGFR. Erst in hohen Konzentrationen, die in-vivo nicht erreicht werden, hemmt BIBX1382BF auch den ErbB4-Rezeptor (BAUMANN et al. 2003, EGEHLAD et al. 2001, NUIJEN et al. 2000).

5.4.1 Wirkung von BIBX1382BF auf Ulkuszinzidenz und zeitlichen Verlauf

Bei einwöchiger Bestrahlung führt die Behandlung mit BIBX1382BF an den Tagen 0–7 zu einer ED_{50} von $8,3 \pm 1,6$ Gy. Der Unterschied zur ED_{50} der alleinigen fraktionierten Bestrahlung ohne EGFR-Inhibitor ist nicht signifikant ($p=0,1197$). Bei zweiwöchiger Bestrahlung in Kombination mit BIBX1382BF-Applikation von Tag 0–14 ergibt sich eine ED_{50} von $7,6 \pm 1,6$ Gy, ebenfalls ohne signifikanten Unterschied zur alleinigen fraktionierten Bestrahlung ($p=0,2263$).

Die Ulkuszdauer ist in beiden Versuchssarmen nicht signifikant verschieden. Die Latenzzeit bis zur Ulzeration ist nach einer Woche fraktionierter Bestrahlung nicht signifikant reduziert von $9,0 \pm 1,1$ auf $8,4 \pm 1,2$ Tage ($p=0,13$). Nach zwei Wochen fraktionierter Bestrahlung ist eine vergleichbare, aber signifikante Reduktion der Latenzzeit von $6,0 \pm 0,8$ auf $5,3 \pm 0,5$ Tage ($p=0,001$) zu finden, was eine Wirkung von BIBX1382BF in der Mundschleimhaut nachweist. Offensichtlich hemmt BIBX1382BF die Effektivität der abortiven Teilungen bereits geschädigter Zellen, die in diesem Zeitraum wesentlich zur Zellproduktion im Epithel und damit zur Verzögerung der Zelldepletion beitragen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die tägliche Verabreichung des EGFR-Inhibitors BIBX1382BF unter fraktionierter Bestrahlung nicht zu einer signifikanten Änderung der

Strahlentoleranz führt. Weitere, gezielte Studien zur Kombination von EGFR-Inhibitoren und Strahlentherapie an der Mundschleimhaut liegen in der Literatur nicht vor.

In einer Studie von BAUMANN et al. (2003) an Plattenepithelkarzinomen an Nacktmäusen kann ebenfalls kein Effekt durch die BIBX1382BF-Gabe und klinisch fraktionierter Bestrahlung auf die Tumorheilungsrate beobachtet werden. Dagegen wird das Tumorwachstum beeinträchtigt und die Tumorstadiumsverzögerung nach Radiotherapie ist deutlich verlängert. Auch KRAUSE et al. (2007) findet durch die EGFR-Blockade zwar eine signifikante Reduktion des Tumorstadiums, aber keine Verbesserung der Tumorkontrolle. Dies bestätigt, dass diese Substanz offensichtlich nicht die Vermehrung klonogener Zellen, welche die Strahlentoleranz definieren, jedoch die residuelle Proliferation bereits geschädigter Zellen, die das Größenwachstum der Tumoren wesentlich beeinflussen können, hemmen kann.

Andere präklinische Studien zeigen, dass die Blockade des EGFR, entweder mit monoklonalen Antikörpern oder Tyrosinkinase-Inhibitoren, die Strahlensensitivität von unterschiedlichen humanen Tumorzellen erhöht (HUANG u. HARARI 2000, TOULANY et al. 2006). Diese vielfältigen Ergebnisse bestätigen eine ausgeprägte intertumorale Heterogenität des Ansprechens auf die gleiche Behandlung in verschiedenen Tumoren, aber auch eine unterschiedliche Wirkung verschiedener Substanzklassen in den gleichen Tumoren. Letzteres kann auf eine mangelnde Spezifität der Rezeptorblockade zurückzuführen sein. Somit ist zu vermuten, dass auch die Wirkung einer EGFR-Inhibition in Normalgeweben für verschiedene Substanzen unterschiedlich sein kann, was weiter zu untersuchen ist.

5.5 Einfluss von Keratinozyten-Wachstumsfaktor

5.5.1 Fraktionierte Bestrahlung und Wirkung von BIBX1382BF und /oder KGF

In den vorliegenden Untersuchungen wird die Gabe von BIBX1382BF und KGF kombiniert. Die rHuKGF-Gabe erfolgt an den Tagen -3, +4 und (bei 10x3 Gy) +11, den Tagen mit der besten nachgewiesenen Wirksamkeit (DÖRR et al. 2005d). Die KGF-Dosen entsprechen ebenfalls den in vorangegangenen Untersuchungen als optimal ermittelten Dosen (DÖRR et al. 2005d).

Die Gabe von KGF in Verbindung mit der fraktionierten Bestrahlung über eine Woche führt in nahezu zeitgleich durchgeführten Versuchen zu einer deutlichen Erhöhung der isoeffektiven Dosen, mit einer $ED_{50}=14,3\pm1,6$ Gy (DÖRR et al. 2005d) im Vergleich zu $ED_{50}=6,7\pm2,1$ Gy bei alleiniger Bestrahlung. Bei gleichzeitiger EGFR-Blockade mit BIBX1382BF ist die Toleranzerhöhung deutlich geringer ausgeprägt. Abbildung 33 zeigt die ED_{50} -Werte im Vergleich.

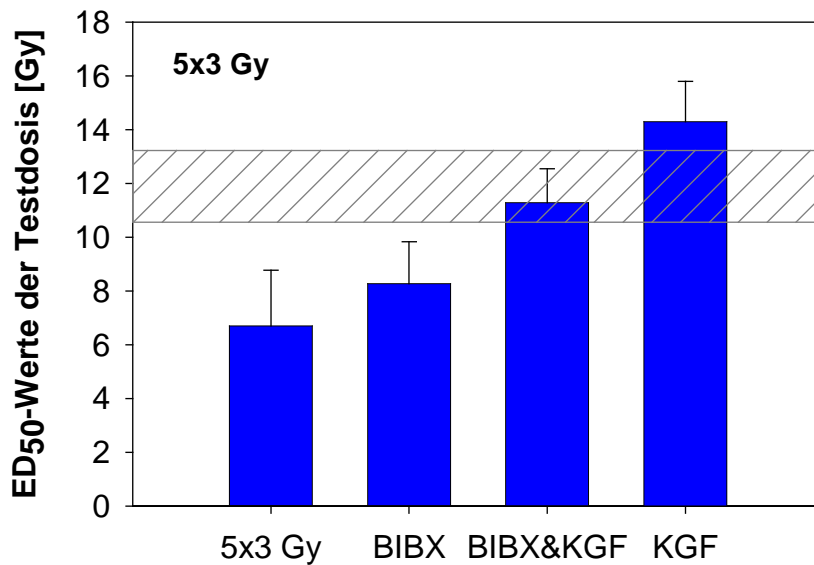


Abb. 33: ED₅₀-Werte bei einwöchiger Fraktionierung mit Applikation von BIBX1382BF und/oder KGF im Vergleich.

Die Ergebnisse der alleinigen Gabe von KGF stammen von DÖRR et al. (2005d). Die alleinige Gabe von BIBX1382BF erhöht die Strahlentoleranz nicht signifikant. Die zusätzliche oder alleinige Gabe von KGF führt zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Der schraffierte Bereich stellt die ED₅₀±σ für die lokale Einzeitbestrahlung ohne vorherige fraktionierte Dosis dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung σ der ED₅₀-Werte.

Auch bei der fraktionierten Bestrahlung mit 10x3 Gy (Abb. 33) ist die Strahlentoleranz gegenüber der alleinigen Bestrahlung und der zusätzlichen Behandlung mit BIBX1382BF durch KGF signifikant ($p=0,0001$) erhöht. Die ED₅₀ entspricht nahezu derjenigen nach alleiniger Einzeitbestrahlung. Der ED₅₀-Wert ($15,1 \pm 0,1$ Gy) der KGF-Applikation ohne BIBX1382BF (DÖRR et al. 2005d) ist im Vergleich zur kombinierten Behandlung mit BIBX1382BF, genauso wie bei der Bestrahlung mit 5x3 Gy, deutlich höher (Abb. 34).

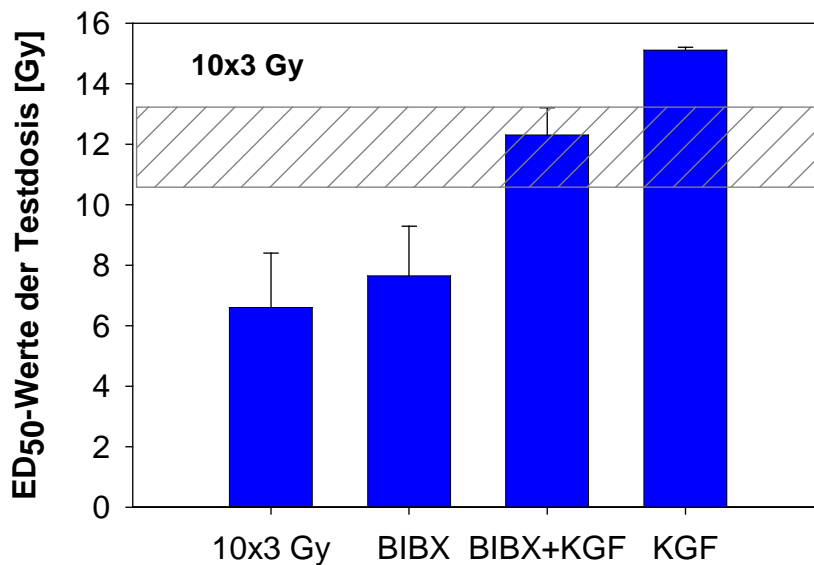


Abb. 34: ED₅₀-Werte bei Fraktionierung von 10x3 Gy und Applikation von BIBX1382BF und/oder KGF.

Die Ergebnisse der alleinigen Gabe von KGF stammen von DÖRR et al. (2005d). Die alleinige Gabe von BIBX1382BF erhöht die Strahlentoleranz nicht signifikant. Die zusätzliche oder alleinige Gabe von KGF führt zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Der schraffierte Bereich stellt die ED₅₀±σ für die lokale Einzeitbestrahlung ohne vorherige fraktionierte Dosis dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung σ der ED₅₀-Werte.

Die mittlere Latenzzeit und Ulkusdauer bei 5x3 Gy zeigen in allen drei Versuchen keinen signifikanten Unterschied zur alleinigen fraktionierten Bestrahlung (Latenz: 9,0±1,1 Tage, Ulkusdauer: 2,8±0,7 Tage).

Bei der Bestrahlung von 10x3 Gy wird im Vergleich zur Kontrolle mit alleiniger fraktionierter Bestrahlung (6,0±0,8 Tage) und Gabe von BIBX1382BF (5,3±0,5 Tage) eine signifikante Verlängerung der Latenzzeit auf 8,7±1,1 Tage ($p=0,0001$) festgestellt. Die Ulkusdauer ist zwar etwas erhöht, aber nicht signifikant. Auch DÖRR et al. (2005d) findet eine signifikant erhöhte Latenzzeit (9,3±0,9 Tage) bei KGF-Gabe an den Tagen -3, +4 und +11 und Bestrahlung mit 10x3 Gy.

5.5.2 Statistische Aussagekraft der Untersuchungen

Ein kritischer Aspekt der vorliegenden Ergebnisse zur Veränderung der Strahlentoleranz ist die Sensitivität des experimentellen Protokolls. Entsprechend der verwendeten Tieranzahl und Dosisgruppen (je 5 Dosisgruppen mit je 10 Tieren) könnte eine behandlungsbedingte Verschiebung der Dosis-Effekt-Kurve für die Testbestrahlung um 1 Gy als eine signifikante Differenz in der Likelihood-ratio Analyse als signifikant festgestellt werden (DÖRR pers. Mitteilung). Auf die Darlegung der entsprechenden Modellrechnungen soll hier verzichtet werden. Somit sind die vorliegenden Ergebnisse zum Einfluss der EGFR-Blockade wie auch zur Interaktion mit der Mukoprotektion durch KGF von statistischer Seite uneingeschränkt aussagekräftig.

5.5.3 Wirkung von KGF bei der gemeinsamen Gabe mit BIBX1382BF

In der vorliegenden Studie wird der Tyrosinkinase-Hemmer BIBX1382BF in einer Konzentration von 50 mg/kg zur spezifischen Blockade des EGFR eingesetzt. Ein Vertreter der EGFR-Familie, ErbB4, wird in den oberen Schichten der humanen Mundschleimhaut exprimiert (SRINIVASAN et al. 1998) und scheint die gleiche Expression in der murinen Schleimhaut zu besitzen, d.h. im postmitotisch differenzierten Kompartiment. Durch die Bindung der zytoplasmatischen Domäne des ErbB4 mit der proteinbindenden SH-2-Domäne wird der mitogen-wirkende Proteinkinaseweg aktiviert (SEPP-LORENZINO et al. 1996) und setzt Differenzierungsprozesse in Gang (PLOWMAN et al. 1993). Die Effekte, die in dieser Studie festgestellt werden, basieren eher auf der Blockade des EGFR (=ErbB2) durch BIBX1382BF. Auf die Effizienz von BIBX1382BF in dieser Studie weist die Modifikation der Latenzzeit bis zum Auftreten der Ulzeration hin.

Die vorliegende Studie findet keine signifikante Veränderung der Residualtoleranz nach EGFR-Inhibition innerhalb der ersten Woche der fraktionierten Bestrahlung, in der normalerweise keine effiziente Repopulation vorhanden ist. Auch in der zweiten Woche der fraktionierten Bestrahlung mit 10x3 Gy, in der die Repopulation aktiv ist, kann keine signifikante Änderung der Dosis-Effekt-Kurve gefunden werden.

Die Ergebnisse zeigen eine Reduktion der Latenzzeit bis zur Ulzeration durch BIBX1382BF bei der Bestrahlung mit 10x3 Gy. Die Latenzzeit in Top-up Experimenten ist abhängig von der Anzahl sterilisierter Zellen zum Zeitpunkt der Testbestrahlung. Durch die begrenzte Teilungsfähigkeit sterilisierter Zellen wird eine bestimmte proliferative Aktivität während der fraktionierten Bestrahlung und über die Wochenenden aufrechterhalten (DÖRR 1997a, 2003b). Die Effektivität der abortiven Teilungen der sterilisierten Zellen in der Mundschleimhaut der Maus ist in der zweiten Woche stärker ausgeprägt als in der ersten unter fraktionierter Bestrahlung (DÖRR 1997a, 2003b, DÖRR et al. 1994). Die Beeinträchtigung der proliferativen Aktivität solcher Zellen könnte zur Verkürzung der Latenzzeit führen.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die Aktivierung des EGFR während der Strahlentherapie nicht zur Repopulierung im Sinne einer Erhöhung der Strahlentoleranz beiträgt. Ansonsten müsste die Blockade in einem signifikanten Absinken der Residualtoleranz gegenüber alleiniger fraktionierter Bestrahlung zumindest nach der zweiten Woche resultieren.

Trotzdem zeigt KGF bei der gemeinsamen Gabe mit BIBX1382BF bei 5x3 Gy und 10x3 Gy eine im Gegensatz zur alleinigen KGF-Behandlung verminderte Schutzwirkung. Somit muss eine Interaktion von BIBX1382BF mit der KGF-Wirkung, möglicherweise durch eine unspezifische Blockade des KGF-Rezeptors, vorliegen.

5.6 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Die histologischen Parameter Zelldichte und Epithel- bzw. Schichtdicke sind objektiv quantifizierbar und die Ergebnisse damit weitgehend unabhängig vom Untersucher.

Demgegenüber steht die semiquantitative Erfassung der immunhistochemischen Färbeintensität. Auch hier wird, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, die Auswertung ausschließlich durch die Autorin vorgenommen. Zudem erfolgt jeweils die Auswertung aller Präparate einer Versuchsreihe in einer Sitzung.

In der vorliegenden Arbeit wird in den histologischen Untersuchungen im Epithel eine durchschnittliche Gesamtzellzahl von 578 ± 5 pro mm Epithellänge ermittelt. Davon befinden sich 431 ± 6 Zellen/mm (75%) in der Germinativschicht.

DÖRR u. KUMMERMEHR (1991) finden in ihren Untersuchungen durchschnittlich 430 ± 12 Zellen im Epithel pro mm, von denen sich 306 ± 5 Zellen (71%) im Stratum germinativum befinden. In einer weiteren neueren Arbeit von KLAMMT (2005) werden im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung ebenfalls etwas niedrigere Zellzahlen im nativen Epithel ermittelt (Gesamtzellzahl: 519 ± 21 /mm, Germinativschicht: 377 ± 14 /mm, d.h. 73%). Übereinstimmend kann somit in allen Untersuchungen - unabhängig von der absoluten Zellzahl - festgestellt werden, dass die Zellzahl der Germinativschicht etwas mehr als zwei Drittel der Gesamtzellzahl beträgt.

Unterschiede in der absoluten Zellzahl können verschiedene Ursachen haben. Die früheren Untersuchungen (DÖRR u. KUMMERMEHR 1991) finden unter anderen Haltungsbedingungen in den Tierräumen des GSF-Forschungszentrums München-Neuherberg (jetzt Helmholtzzentrum München) statt, während die neueren und auch die vorliegenden Daten in der Tierhaltungseinrichtung der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus in Dresden erhoben werden. Unterschiede in der Futterzusammensetzung, aber auch in den Haltungsbedingungen allgemein, können zu einer unterschiedlichen mechanischen Beanspruchung der Mundschleimhaut und damit zu unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften auch beim gleichen Tierstamm führen. Weiterhin ist es möglich, dass verschiedene Untersucher Zellen unterschiedlich in die Auswertung einbeziehen. Dies betrifft bevorzugt Anschnitte von Zellkernen im histologischen Schnitt, sogenannte „Schattenkerne“. Auch können relativ geringe Differenzen in der Dicke der histologischen Schnitte in verschiedenen Untersuchungen, z.B. in Folge der Verwendung unterschiedlicher Mikrotome zu systematischen Unterschieden in den Ergebnissen führen.

5.6.1 Veränderungen im Epithel nach Einzeitbestrahlung

Nach einem Zellverlust von 20% der Zellen pro Tag (bei einer Umsatzzeit von 5 Tagen) müsste nach Bestrahlung unter der Voraussetzung einer vollständigen Hemmung der Proliferation ein vollständiger Zellverlust nach ca. 5 Tagen eintreten (DÖRR u. HERRMANN 2003). Detaillierte Studien von DÖRR u. KUMMERMEHR (1991) sowie von KLAMMT (2005) zeigen jedoch, dass bereits ab dem zweiten Tag die Progression des Zellverlustes durch einsetzende Regenerationsvorgänge verlangsamt wird. Das Minimum der Zellzahl wird an den Tagen 6-7 beobachtet. Bis Tag 13 ist die Ausgangszellzahl wieder erreicht.

Die Epitheldicke nimmt in einer vergleichbaren Untersuchung nach Einzeitbestrahlung (KLAMMT 2005) erst geringfügig ab und stieg nach 6 bis 7 Tagen sprunghaft an. Die hauptsächliche Ursache der Dickenzunahme von Tag 7 bis 11 ist eine Zunahme der Zellvolumina trotz verminderter Zellzahl. Danach spielt die stetig zunehmende Zellproduktion die wichtigere Rolle (KLAMMT 2005).

Die Anzahl der Mitosen und der Ki-67 positiven Zellen zeigt kurz nach der Bestrahlung einen deutlichen Rückgang. Nach 10 Tagen nimmt die Anzahl an Mitosen und Ki-67 positiven Zellen und in Folge dessen auch die Zelldichte wieder stark zu (KLAMMT 2005).

Hier ist anzumerken, dass Untersuchungen zu nur einem Zeitpunkt pro Tag in Folge des ausgeprägten diurnalen Rhythmus der Zellproliferation und dessen Modifikation durch die

Strahlenexposition (DÖRR 1987) irreführende Ergebnisse liefern können. Hier wären gezielte Untersuchungen, etwa mit Metaphasenarretierung in vierstündigen Abständen über 24 Stunden pro Tag, wie sie unter fraktionierter Bestrahlung durchgeführt wurden (DÖRR 1987), nötig.

5.6.2 Fraktionierte Bestrahlung

Die Zelldichte nimmt in der vorliegenden Arbeit unter der Bestrahlung mit 5x3 Gy (Tag 0-4) bis zum Tag 6 auf 74% der Ausgangszellzahl ab. In anderen Studien mit 2,5-3,5 Gy/Fraktion wird ebenfalls eine Reduktion der Zelldichte auf ca. 70% innerhalb der ersten 5 Tage beobachtet (DÖRR 1994, DÖRR et al. 1994b, DÖRR u. KUMMERMEHR 1990). Nach dem Ende der einwöchigen Bestrahlung hat sich die Zellzahl in allen Schichten an Tag 10, d.h. innerhalb von 4 Tagen, wieder vollständig erholt.

Bei einer Dosis von 10x3 Gy bleibt die Zellzahl bis Tag 14 bei 60-70%, trotz fortgesetzter Bestrahlung. Vergleichbare Ergebnisse zum Verhalten der Zellzahl unter fraktionierter Bestrahlung findet DÖRR (1994, 1997a). In der ersten Woche ist die Reduktion der epithelialen Zelldichte dosisabhängig. Durch kompensatorische Vorgänge wird dieser Prozess der Zelldepletion bei einer Zelldichte von 60-70% in der zweiten Woche unterbrochen.

Die Gesamtepitheldicke verhält sich nur am Beginn der Bestrahlung wie die Zellzahl. Schon an Tag 1 während der Bestrahlung mit 5x3 Gy sinkt der Wert auf 66% (Abb. 20). Bis zum Tag 3 bleibt die Epitheldicke auf diesem Niveau, um dann durch die Zunahme des Zellvolumens bis zum Tag 5 wieder Ausgangswerte zu erreichen. Die Dicke des Epithels bleibt bis Tag 10 auf bzw. geringfügig unter dem Niveau des Ausgangswertes. Bei der Auswertung der Dicke der einzelnen Schichten fällt auf, dass zwar an Tag 1 sowohl die Germinativ- als auch die Funktionsschicht deutlich an Dicke abnehmen, aber im weiteren Verlauf beide Schichten nahezu wieder die Ausgangswerte erreichen (Abb. 23). Die Dicke der Keratinschicht bleibt dagegen von Tag 0-10 auf einem normalen bis supernormalen Niveau.

Bei der Bestrahlung mit 10x3 Gy kann ab der zweiten Woche eine erhöhte Epitheldicke nachgewiesen werden (Abb. 21). Ab Tag 12 bis 17 findet sich fast durchgehend eine Verdopplung der Werte. Die Dicke der *Germinativschicht* bleibt von Tag 8 bis 14 auf Ausgangsniveau, danach zeigt sie bis Tag 17 eine um 20% erhöhte Dicke (Abb. 25). Die Dicke der *Funktionsschicht* liegt bis einen Tag nach der Bestrahlung (Tag 12) mit bis zu 40% über dem Ausgangswert. Danach erfolgt ein leichter Rückgang, bis an Tag 17 wieder die Dicke um 40% erhöht ist. Die hauptsächliche Ursache für die Verdopplung der Gesamtepitheldicke liegt in einer Zunahme der Keratinschicht, die teilweise das Sechsfache des Ausgangswertes erreicht. Bei der Betrachtung des Zellvolumens in der Germinativschicht zeigt sich eine Erhöhung um 30-40% des Zellvolumens von Tag 9-15. Die Erhöhung des Zellvolumens scheint den Rückgang der Zellzahl im Vergleich zur gleichbleibenden Dicke der Germinativ- und Funktionsschicht besonders in der zweiten Woche auszugleichen. DÖRR (1997a) findet ebenfalls, dass bei nahezu gleichbleibender Gesamtdicke des Epithels und einer Abnahme der Zellzahl auf 60-70% sich in der ersten Woche der Bestrahlung das individuelle Zellvolumen auf ca. 130% erhöht. Der Anstieg der Zellzahl nach der zweiten Behandlungswoche ab Tag 13 korreliert mit der verzögerten Dickenzunahme in der Germinativschicht und später auch in der Funktionsschicht. Vergleichbare Studien zur Gesamtepitheldicke bei fraktionierter Bestrahlung über zwei Wochen finden sich in der Literatur nicht. In älteren Studien

(DÖRR 1997a, DÖRR u. KUMMERMEHR 1990, DÖRR et al. 1994a) werden zumeist nur die Zellzahlen ermittelt, die aber mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen in Übereinstimmung sind.

Für die Untersuchung von Proliferationsvorgängen unter fraktionierter Bestrahlung zu nur einem Zeitpunkt pro Tag gelten die für die Einzelbestrahlung dargestellten Einschränkungen. Jedoch kehrt die Proliferation im Epithel bereits in der ersten Bestrahlungswoche zu einem – allerdings irregulären – Tagesrhythmus zurück (DÖRR 1997a), so dass die Aussagekraft ab diesem Zeitpunkt etwas größer sein mag. Die Unterschiede in den Befunden zu Mitosezahl und Ki-67 positiven Zellen sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Auswirkungen der Bestrahlung auf die Tagesrhythmen der beiden Parameter zurückzuführen.

In der vorliegenden Untersuchung kommt es zu Beginn der fraktionierten Bestrahlung an den Tagen 1 und 2 zu einer Abnahme der Ki-67 positiven, d.h. proliferierenden Zellen bis auf 35%. Danach erfolgt noch während der Bestrahlung ein Anstieg, der schon an Tag 6 über den Werten des unbehandelten Epithels liegt. Bei nur einwöchiger Bestrahlung erreicht die Zahl an proliferierenden Zellen an Tag 10, d.h. in der Heilungsphase, 158%. Die Mitosezahl zeigt diesen Aspekt an den ersten beiden Tagen der fraktionierten Bestrahlung nicht, da die Anzahl gleich zur unbehandelten Kontrolle bleibt. Ab Tag 2 erfolgt ein leichter Anstieg der Mitosen, der mit der Zunahme an proliferierenden Zellen korreliert.

Während der fraktionierten Bestrahlung mit 10x3 Gy bleibt die Anzahl proliferierender Zellen in der zweiten Woche bis Tag 13 auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle. Danach steigt sie bis Tag 17 auf Werte im Bereich von 175%. Der Verlauf gleicht dem der Zellzahl in der zweiten Woche. Dagegen zeigt die Mitosezahl einen stark fluktuierenden Verlauf, der keinen Vergleich zum Anstieg der proliferierenden Zellen erlaubt.

5.6.3 Einfluss von BIBX1382BF

Bei der fraktionierten Bestrahlung mit 5x3 Gy und EGFR-Blockade mit BIBX1382-Gabe ergibt sich an den Tagen 3-7 eine gering reduzierte Zellzahl im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. In der Heilungsphase zeigen sich keine Unterschiede.

Unter der fraktionierten Bestrahlung mit 10x3 Gy bewirkt die EGFR-Blockade ebenfalls keine Unterschiede zur alleinigen Bestrahlung.

Die Epitheldicke bei der Bestrahlung mit 5x3 Gy verläuft vergleichbar der alleinigen fraktionierten Bestrahlung.

Bei der Bestrahlung mit 10x3 Gy und EGFR-Inhibition liegt die Epitheldicke deutlich unter derjenigen der alleinigen fraktionierten Bestrahlung. Die Ursache liegt hauptsächlich in einer geringeren Zunahme der Keratinschicht (Abb. 25).

Die Behandlung mit BIBX1382BF führt ebenfalls zu einem Absinken der proliferierenden Zellen an den Tagen 1 und 2 nach Beginn der Bestrahlung. Beide Proliferationsparameter sinken an Tag 2 nahezu auf 0. Bei der alleinigen fraktionierten Bestrahlung ist die Abnahme nicht so deutlich ausgeprägt, ohne dass diesen Ergebnissen viel Gewicht beigemessen werden darf, auf Grund der eingangs erwähnten Einschränkungen in der Aussagekraft dieser Untersuchungen.

Unter Bestrahlung mit 10x3 Gy findet sich kein Einfluss von BIBX1382BF auf die Proliferationswerte.

5.6.4 Einfluss von KGF zusammen mit BIBX1382BF

Die vorliegenden Untersuchungen zur Bestrahlung mit 5x3 Gy zeigen, dass durch die kombinierte Gabe von BIBX1382BF und KGF an den Tagen 1 und 2 ein leichter Anstieg der gesamten Zelldichte zu verzeichnen ist (Abb. 18). Danach sinkt die Zellzahl auf Werte um 70% an Tag 4 und damit früher als in den Vergleichsuntersuchungen. Die zweite KGF-Injektion (Tag 4) resultiert in einem raschen Anstieg der Zellzahl auf ihren Ausgangswert an Tag 5, mit einer nachfolgenden Hyperplasie.

Die initiale Zunahme der Zellzahl betrifft nahezu ausschließlich die Funktionsschicht. Dies könnte durch eine KGF-bedingte Erhöhung des Einstroms von Zellen aus der Germinativschicht verursacht sein oder aber durch einen verminderten Zellverlust, ohne dass diese Frage anhand der vorliegenden Ergebnisse zu beantworten wäre. Nach Einzeitbestrahlung und Behandlung mit KGF wird ein ähnliches Verhalten in der Funktionsschicht gefunden (KLAMMT 2005). Ab Tag 5, nach der zweiten KGF-Gabe, steigen die Zellzahlen sowohl in der Germinativ- als auch besonders in der Funktionsschicht wieder an. KERRES et al. (2003) beschreiben histologische Veränderungen im Epithel durch fraktionierte Bestrahlung und KGF-Applikation. Es kommt ebenfalls zu einer temporären Zunahme der Zellzahl.

Bei der fraktionierten Bestrahlung mit 10x3 Gy liegen die Zellzahlen bei der kombinierten Gabe von BIBX1382BF und KGF zu Beginn der zweiten Woche über denjenigen nach alleiniger fraktionierter Bestrahlung und Bestrahlung mit BIBX1382BF-Gabe. Im Anschluss an die dritte KGF-Applikation an Tag +11 steigt die Gesamtzellzahl schnell wieder an. Der starke Abfall der Zellzahl an den Tagen 8-11 wird durch den Zellverlust in der Germinativschicht verursacht. Die Funktionsschicht reagiert zeitverzögert mit. An Tag 11 sind die Zellzahlen beider Schichten im Bereich der alleinigen fraktioniert-bestrahlten Kontrolle, nur die alleinige Behandlung mit BIBX1382BF führt zu noch tieferen Werten.

Die Dicke des gesamten Epithels unter fraktionierter Bestrahlung mit kombinierter Gabe von BIBX1382BF und KGF bleibt in den ersten Tagen im Normalbereich, bis sie ab Tag 6 sprunghaft bis auf 219% ansteigt (Abb. 20). An Tag 10 ist das Epithel noch um ca. 25% dicker als bei der alleinigen fraktionierten Bestrahlung, was mit der erhöhten Zellzahl übereinstimmt. Auch bei der alleinigen Gabe von BIBX1382BF bleiben die Werte auf dem Niveau des unbehandelten Epithels. Der Anstieg erfolgt durch die Zunahme der Zellgröße (Zellvolumen) in den tieferen Epithelschichten.

POTTEN et al. (2002) beobachten an BDF-1 Mäusen nach Applikation von KGF eine Verdopplung der Epitheldicke und Vergrößerung der Zellen nach Einzeitbestrahlung. Ähnliche Resultate findet KLAMMT (2005) nach Einzeitbestrahlung und KGF-Behandlung. Als Grund wurde die vermehrte Akkumulation von Differenzierungsprodukten in Folge eines verzögerten Zellverlusts sowie eine ödematöse Schwellung der Zellen diskutiert. FARRELL et al. (2002) finden nach KGF-Gabe und Einzeitbestrahlung (12 Gy, BDF-1 Mäuse) nicht nur die Verdopplung der Epitheldicke, sondern auch die Vermehrung und Vergrößerung der Keratohyalingranula als Differenzierungsprodukt.

Die Epitheldicke bei der fraktionierten Bestrahlung mit 10x3 Gy ist über den gesamten Beobachtungszeitraum höher als das unbestrahlte native Epithel. Die letzte KGF-Injektion an Tag +11 führt zu einem steilen Anstieg der Dicke auf 353% bis zum Tag 13. Die Keratinschicht hat den größten Anteil an der Dickenzunahme des Epithels (Abb. 25).

Das relative Zellvolumen in der Germinativschicht ist in der zweiten Woche weniger erhöht als in der ersten Woche.

Die Behandlung mit BIBX1382BF und KGF führt wie bei der alleinigen fraktionierten Bestrahlung und Bestrahlung mit BIBX1382BF-Gabe zu einem Absinken der proliferierenden Zellen an den ersten Tagen nach Bestrahlungsbeginn (Abb. 29). Es können an den Tagen 1-3 nahezu keine Ki-67 positiven Zellen gezählt werden. Dieser Zeitraum ist länger als im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsarmen. An Tag 11 verursacht die KGF-Applikation einen deutlichen Anstieg der Zahl proliferierender Zellen.

Die Mitosezahl zeigt erst an Tag 13, zwei Tage nach KGF-Applikation, einen auffälligen Anstieg auf knapp 3 Mitosen/mm Epithellänge.

5.7 Theorien zum Wirkmechanismus von KGF

Die Palifermin-Behandlung führt, wie in Studien von FARRELL et al. (2002), KERRES et al. (2003), KLAMMT et al. (2005) und POTTEN et al. (2002) nachgewiesen, zu einer Veränderung der Strahlenwirkung. Die genauen Wirkmechanismen von KGF sind noch nicht geklärt. Vermutet wird eine unterschiedliche Wirkung bei Gabe vor bzw. unter Bestrahlung. Bei der rHuKGF-Gabe vor der Bestrahlung nimmt die Latenzzeit zu (DÖRR et al. 2002c). Palifermin bedingt einen Anstieg der totalen Zellzahl, so dass ein längerer Zeitraum bis zum Zellverlust benötigt wird. Die einmalige Paliferingabe am Tag vor fraktionierter Bestrahlung führt zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahlen im Epithel (KERRES et al. 2003). KLAMMT (2005) bestätigt die Steigerung der Proliferationsrate unter Einzeitbestrahlung, die u.a. zum mukoprotektiven Effekt von KGF bei Applikation nach Strahlenexposition beiträgt. Jedoch kann die Abnahme der Latenzzeit bei alleiniger Applikation nach der Bestrahlung nicht erklärt werden (DÖRR u. LACMANN 2001). Somit müssen noch andere, komplexe Mechanismen zur Wirkung beitragen. Zusätzlich unterscheidet sich die Wirkung von KGF bei Einzeit- und fraktionierter Bestrahlung. Unter fraktionierter Bestrahlung zeigt die einmalige Bolusgabe von Palifermin die gleiche Wirksamkeit wie die dreimalige Applikation (DÖRR et al. 2002a, 2005a). Dagegen führt die Einzelinjektion von KGF, im Gegensatz zur wiederholten Gabe, zu keiner mukoprotektiven Wirkung (KILIÇ et al. 2007).

Eine weitere Theorie zum Wirkmechanismus von KGF ist die Stimulation der Stammzellproliferation. KGF könnte das Teilungsmuster der Stammzellen verändern, mit einem Wechsel von asymmetrischer Teilung (eine Stammzelle und eine sich differenzierende Tochterzelle) zu symmetrischer Teilung (zwei Tochter-Stammzellen) (DÖRR 1997a, 2003b). Daraus ergäbe sich ein Zuwachs von Stammzellen. Palifermin scheint zudem die zelluläre Überlebensrate der Stammzellen zu verbessern, indem es die Zellüberlebensparameter bzw. die zelluläre Erholungsfähigkeit beeinflusst (KERRES et al. 2003).

KGF führt des Weiteren zur Modifikation von Differenzierungsprozessen. Durch die Gabe von KGF kommt es zur Zunahme des Zellvolumens (KLAMMT 2005, POTTEN et al. 2002). FARRELL et al. (2002) finden nach Paliferingabe vermehrt Keratohyalingranula, ein Differenzierungsprodukt. Die Zunahme der Keratinschicht, wie auch in der vorliegenden Studie, untermauert die Beteiligung an Differenzierungsprozessen. Möglicherweise ist die Zunahme von Differenzierungsprodukten eine Ursache für das erhöhte Zellvolumen. Andererseits könnte auch ein intrazelluläres Ödem die Zunahme der Zellgröße hervorrufen. Sowohl der

Anstieg der Zellgröße als auch die Dicke der Keratinschicht führen zu einer Zunahme der Gesamtepitheldicke, welche der Denudation des Epithels entgegenwirkt.

5.7.1 Tumorwirksamkeit von rHuKGF

Ein wichtiger Aspekt bei der Modifikation von Normalgewebsreaktionen bei onkologischen Behandlungen ist die Selektivität, d.h. eine gleichsinnige Beeinflussung (Schonung) des Tumorgewebes muss ausgeschlossen sein. Deshalb wurde in mehreren in-vivo und in-vitro Studien die KGF-Wirkung auf Tumorgewebe untersucht.

In-vitro Versuche zeigen eine sehr unterschiedliche Expression von KGF-Rezeptoren an epithelialen Tumorzellen. An sieben von zehn Kopf-Hals-Tumor-Zelllinien entdeckt NING et al. (1998) KGF-Rezeptoren mit Hilfe eines RNase Protection Assay. Eine proliferative Wirkung von KGF kann nur an vier von den sieben KGFR-positiven und zwei KGFR-negativen Tumorzelllinien beobachtet werden. Bei normalen Keratinozyten ist die proliferative Wirkung um das 24-70 fache höher, als bei den Tumorzellen (NING et al. 1998). HILLE et al. (2003) findet in sechs von acht primären Tumorzelllinien, die von Kopf-, Hals- oder Lungentumoren stammen, nachweisbare KGF-Rezeptoren-mRNA, aber nur in einer Linie eine signifikante proliferative Wirkung. In Choriokarzinomzellen mit KGF-Rezeptoren wird eine Stimulation der hCG-Sekretion nachgewiesen, aber keine Proliferation (FINCH u. RUBIN 2006).

In-vivo Versuche mit rHuKGF an KHT-Sarkomen, die intramuskulär in C3H-Mäuse transplantiert werden, zeigen eine Senkung der mittleren Distanz zwischen den Blutgefäßen und den Tumorzellen, d.h. das hypoxische Volumen sinkt durch die Behandlung. Des Weiteren kann eine Reduktion des Tumorwachstums festgestellt werden. Die KGF-Gabe führt zu einem Anstieg des Apoptose-Index (DÖRR et al. 2003).

Studien an Xenograft-Tumoren in Nacktmäusen weisen nach, dass KGF die Wachstumsrate von Tumoren weder fördert, noch das strahlenbedingt langsamere Tumorwachstum verändert (NING et al. 1998).

Das Ziel neuerer Untersuchungen ist es, KGF zur Behandlung der Nebenwirkungen z.B. der Mucositis enorales bei einer Radiochemotherapie von soliden Tumoren einzusetzen. Für die Behandlung der strahleninduzierten Mukositis durch eine Radiochemotherapie im Rahmen hämatologisch-onkologischer Erkrankungen ist Palifermin zugelassen. Blutzellen besitzen im Gegensatz zu epithelialen Zellen keine KGF-Rezeptoren (FGFR2b) (FINCH u. RUBIN 2006). Es kann nicht endgültig ausgeschlossen werden – obwohl die in-vitro Daten (siehe Kap. 5.8.1.1) und die vorliegenden in-vivo Ergebnisse darauf keinen Hinweis ergeben - dass KGF das Wachstum epithelialer Tumoren und deren Metastasen fördern könnte. Klinische Daten liegen bisher nicht vor.

5.8 Ausblick

Die strahleninduzierte Mucositis enoralis stellt in der Humanmedizin die wichtigste frühe Nebenwirkung bei der Strahlentherapie von fortgeschrittenen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich dar, die häufig eine Unterbrechung der Therapie verursacht. Auch in der Veterinärmedizin nehmen aufgrund der aggressiver werdenden Protokolle die Nebenwirkungen einer Strahlentherapie, und damit auch die orale Mukositis, an Bedeutung zu. Es existieren eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Ansätzen zu Prophylaxe und Behandlung der radiogenen Mukositis, ohne dass bisher ein spezifisches Protokoll allgemeinen Eingang in

die klinische Routine gefunden hat. Die Anwendung von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) stellt diesbezüglich eine viel versprechende Strategie dar.

In der vorliegenden Arbeit wird festgestellt, dass die EGFR-Inhibition – bei Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt zur Verbesserung des Therapieerfolgs – durch BIBX1382BF keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der Mundschleimhaut hat, obwohl durch die signifikante Verkürzung der Latenzzeit nach Bestrahlung über 2 Wochen die Wirksamkeit der Applikation bewiesen ist. Unklar bleibt, ob dieses Ergebnis spezifisch ist für den eingesetzten EGFR-Hemmstoff oder ob eine Abhängigkeit von der Substanz bzw. der Substanzklasse (Tyrosinkinaseinhibitor vs. Antikörper) besteht. Hier sind weitere Studien nötig.

Die mukoprotektive Wirkung von KGF – nachgewiesen in einer Vielzahl präklinischer und erster klinischer Studien – wird laut den vorliegenden Ergebnissen durch die EGFR-Blockade nicht beeinträchtigt. Dem klinischen Einsatz von KGF zur Mukoprotektion auch in Verbindung mit der Kombination von Strahlentherapie und EGFR-Inhibition bei Kopf-Hals-Tumoren stünde somit nichts im Wege. Auch hier müssen jedoch zur Absicherung der Resultate weitere präklinische Untersuchungen mit anderen Substanzen bzw. Substanzklassen durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Astrid Fehrmann

Interaktion einer Blockade des Rezeptors für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) mit der Gabe von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) bei der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut – tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen.

Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus, Universität Dresden

Eingereicht im Juli 2009

98 Seiten, 34 Abbildungen, 16 Tabellen, 213 Literaturangaben, Anlage

Schlüsselwörter: fraktionierte Bestrahlung, Mucositis enoralis, EGFR-Inhibition, BIBX1382BF, KGF

Bei der Strahlentherapie fortgeschrittener Tumoren im Kopf-Hals-Bereich gilt die radiogene Mucositis enoralis als schwerwiegende und dosislimitierende frühe Nebenwirkung. Sehr häufig führt sie zu einer Unterbrechung der Behandlung, mit der Folge einer Reduktion der Tumorheilungschancen. Während einer fraktionierten Strahlenexposition kommt es in der Mundschleimhaut zu einer erhöhten Expression des Epidermalen Wachstumsfaktors (Epidermal Growth Factor, EGF) und dessen Rezeptors (EGFR). Durch eine Blockade des EGFR, als anerkannte Strategie zur Verbesserung der Tumorheilung, besteht deshalb die Gefahr, dass es zu einer Verschlimmerung der Schleimhaut-Nebenwirkungen kommt. Der Einsatz von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) zeigt positive Ergebnisse bezüglich einer Reduktion der Schleimhautveränderungen. In dieser Arbeit wird deshalb im Tiermodell einerseits die Auswirkung einer Blockade des EGFR auf die Schleimhautreaktion, und andererseits eine mögliche Interaktion der Blockade mit der schleimhautschützenden Wirkung von KGF untersucht.

Die Versuche werden an Mäusen vom Stamm C3H/Neu aus der Kolonie des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät der TU Dresden durchgeführt. Zur Anwendung kommen die perkutane (Schnauzenbestrahlung, 200 kV Röntgenstrahlen) und die lokale Bestrahlung der Zungenunterseite. Die fraktionierte Bestrahlung erfolgt mit 3 Gy/d über eine Woche (Tag 0–4) bzw. zwei Wochen (Tag 0–4, 7–11). Dies führt nur zu einer subklinischen Schädigung der Mundschleimhaut. Anschließend wird eine Test-(Top-up)Bestrahlung (25 kV Röntgenstrahlen) eines 3x3 mm² großen Testfeldes auf der Zungenunterseite mit gestaffelten Dosen zur Auslösung einer klinischen Reaktion durchgeführt. Die Inzidenz von mukosalen Ulzerationen im Testfeld wird als klinisch relevanter, quantaler Endpunkt zur Analyse von Dosis-Effekt-Beziehungen mittels eines Logit-Modells herangezogen. Den zeitlichen Verlauf beschreiben die Latenzzeit (von der Testbestrahlung bis zur Erstdiagnose der Ulzera) und die Ulkusdauer (von der Erstdiagnose bis zur makroskopischen Heilung). Einem Teil der Tiere wird zur Blockade des EGFR der Tyrosinkinase-Inhibitor BIBX1382BF (Fa. Boehringer Ingelheim Austria, Wien) an den Tagen 0–7 bzw. 0–14 in einer täglichen Dosis von 50 mg/kg p.o. jeweils 30 min nach Bestrahlung verabreicht. In einem weiteren Versuchsarm erfolgt zusätzlich zur BIBX1382BF-Applikation die subkutane Gabe von rekombinantem humanen KGF (rHuKGF, Palifermin; Fa. Amgen Inc., CA, USA) an den Tagen –3 (15 mg/kg) und 4 (22,5 mg/kg) bei einwöchiger sowie an Tag 11 (15 mg/kg) bei zweiwöchiger Bestrahlung.

Bei ergänzenden histologischen Untersuchungen werden aus jedem Versuchsarm täglich von Tag 0-10 bzw. 8-17 je 3 Zungen entnommen. Lichtmikroskopisch wird das Epithel der Zungenunterseite quantitativ auf Zelldichte (Zellzahl/mm Epithel), Schichtdicke sowie Mitosenanzahl/mm Epithel ausgewertet. Nach immunhistochemischer Darstellung mit TEC-3 wird die Zahl der für den Proliferationsmarker Ki-67 positiven Zellen ermittelt.

Eine alleinige Einzeitbestrahlung ergibt eine ED_{50} (Dosis, bei der bei 50 % der Tiere eine Ulzeration zu erwarten ist) von $11,9 \pm 1,4$ Gy; die Dosisabhängigkeit ist signifikant ($p=0,0001$). Die mittlere Latenzzeit beträgt $9,2 \pm 0,7$ Tage, die Ulkusdauer $2,8 \pm 0,7$ Tage. Bei fraktionierter Bestrahlung über 1 bzw. 2 Wochen ergibt sich für die abschließende Testbestrahlung eine ED_{50} von $6,7 \pm 2,1$ Gy bzw. $6,5 \pm 1,9$ Gy. Die mittlere Latenzzeit beträgt $9,0 \pm 1,1$ Tage bzw. $6,0 \pm 0,8$ Tage. Die mittlere Ulkusdauer beträgt $2,8 \pm 0,7$ Tage bzw. $2,7 \pm 1,0$ Tage.

Die Gabe von *BIBX1382BF* über 1 bzw. 2 Wochen führt zu keinem signifikanten Unterschied der ED_{50} ($8,3 \pm 1,6$ Gy/ $7,6 \pm 1,6$ Gy), der Ulkusdauer ($2,5 \pm 0,8$ Tage/ $2,5 \pm 0,7$ Tage) und der Latenzzeit nach einwöchiger Bestrahlung ($8,4 \pm 1,2$ Tage) gegenüber der alleinigen fraktionierten Bestrahlung. Dagegen ist die Latenzzeit bei Bestrahlung über 2 Wochen ($5,3 \pm 0,5$ Tage) signifikant reduziert. Die zusätzliche Behandlung mit *KGF* führt zu einem signifikanten Anstieg der ED_{50} ($11,3 \pm 1,3$ Gy/ $12,3 \pm 0,9$ Gy) im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsarmen. Die Latenzzeit nach Bestrahlung mit 5×3 Gy ($7,8 \pm 1,1$ Tage) und die Ulkusdauer mit $2,5 \pm 0,8$ Tagen (5×3 Gy) bzw. $3,1 \pm 0,9$ Tagen (10×3 Gy) sind nicht signifikant verschieden. Dagegen ergibt sich bei der Bestrahlung über 2 Wochen eine signifikant verlängerte Latenzzeit ($8,7 \pm 1,0$ Tage).

Der maximale Zellverlust nach fraktionierter Bestrahlung sowohl über eine (auf ca. 70%) als auch über zwei Wochen (auf ca. 60%) wird nach *BIBX1382BF*-Gabe jeweils einen Tag früher als bei der alleinigen Bestrahlung gefunden. Durch die *KGF*-Gabe erfolgt der Zellverlust in der ersten Woche erst 1-2 Tage später, erreicht jedoch das Minimum (ca. 70%) eher. In der zweiten Woche der Bestrahlung findet sich der maximale Verlust von nur ca. 20% der Zellen im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung und zur zusätzlichen Gabe von *BIBX1382BF* 1-2 Tage später, während die Restauration der Zellzahlen bereits 3 Tage früher beobachtet wird. Die Epitheldicke bleibt unter der alleinigen Bestrahlung und zusätzlichen *BIBX1382BF*-Gabe nahezu unverändert. Die *KGF*-Gabe bewirkt ab dem Ende der ersten Bestrahlungswoche eine signifikante Zunahme der Epitheldicke bis auf den Faktor 3 in der zweiten Woche. Ursache ist eine Dickenzunahme der Keratinschicht, aber auch der kernhaltigen Schichten. Letzteres muss auf einer Volumenzunahme der Einzelzellen um bis zu 166% beruhen.

Die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen sinkt durch die EGFR-Inhibition auf 9% im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Die *KGF*-Gabe führt zu einem fast vollständigen Rückgang.

Insgesamt kann keine signifikante Veränderung der Schleimhauttoleranz durch die EGFR-Inhibition mittels *BIBX1382BF* innerhalb der ersten beiden Wochen einer fraktionierten Bestrahlung festgestellt werden; lediglich das Auftreten ulzerativer Läsionen nach der zweiten Woche ist vorverlagert. Ebenso ist keine signifikante Beeinflussung der schleimhautprotektiven Wirkung von *KGF* vorhanden. Einer Kombination von fraktionierter Strahlentherapie mit EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren wie auch der gleichzeitigen Gabe von *KGF* zur Schleimhautprotektion steht somit nichts entgegen. Jedoch bleibt unklar, inwiefern Unterschiede in der Wirkung verschiedener Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinase oder sogar unterschiedlicher Wirkstoffklassen (Tyrosinkinase-Inhibitoren vs. blockierende Rezeptor-Antikörper) bestehen. Hier sind weitere präklinische, funktionelle wie auch mechanistische Untersuchungen nötig.

7 Summary

Astrid Fehrmann

Interaction of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) inhibition with administration of Keratinocyte Growth Factor (KGF) in the radiation response of oral mucosa – experimental studies in the mouse.

Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and Department of Radiotherapy and Radiation Oncologie, Medical Faculty Carl Gustav Carus, University of Technology, Dresden

Submitted in July 2009

98 pages, 34 figures, 16 tables, 213 references, appendix

Keywords: fractionated irradiation, oral mucositis, EGFR inhibition, BIBX1382BF, KGF

Radiation-induced oral mucositis is a severe and dose limiting early side effect during radiotherapy of advanced tumours in the head-and-neck region. It frequently results in unplanned treatment interruptions, with the consequence of a reduction in tumour control rates. During fractionated radiotherapy, an increase in the expression of Epidermal Growth Factor (EGF) and its receptor (EGFR) in oral mucosa has been demonstrated. EGFR inhibition, as an evidence based strategy to improve tumour control, hence bares the risk of aggravation of mucosal complications. The administration of Keratinocyte Growth Factor (KGF) has demonstrated positive results with regard to amelioration of oral mucosal complications. The present investigation was hence initiated in order to assess the effect of EGFR inhibition on the mucosal radiation response and a potential interaction of this inhibition with the mucoprotective efficacy of KGF in an animal model.

All experiments were carried out in mice of the C3H/Neu strain from the colony of the Experimental Center of Medical Faculty Carl Gustav Carus of TU Dresden. Two different techniques were applied for irradiation of oral mucosa: Percutaneous irradiation of the snout (200 kV X-rays) and local irradiation of the lower tongue surface. Fractionated irradiation comprises 5 daily fractions/week over 1 week (days 0-4) or 2 weeks (days 0-4, 7-11). This results only in subclinical mucosal damage. Subsequently, a local test (top-up) irradiation (25 kV X-rays) with graded doses is applied to a 3x3 mm² test area of the lower tongue surface in order to induce a clinical response. The incidence of mucosal ulcerations within the test area is used as a clinically relevant quantal endpoint for dose-effect analyses, with a logit model. The time course of the response is described by the latent time (from test irradiation to first diagnosis of ulceration) and ulcer duration (from first diagnosis to macroscopic healing). A fraction of animals received the tyrosine kinase inhibitor BIBX1382BF (Boehringer Ingelheim Austria, Vienna, Austria) for EGFR inhibition on days 0-7 or 0-14, respectively, 30 min before irradiation at a daily dose of 50 mg/kg p.o. In a further experimental arm, in addition to EGFR inhibition, administration of recombinant human KGF (rHuKGF, Palifermin; Amgen Inc., CA, USA) on days -3 (15 mg/kg) and 4 (22,5 mg/kg) with one week of fractionation, as well as on day 11 (15 mg/kg) with two weeks of fractionation.

In further, histological investigations, 3 tongues from the different experiments are taken out daily on days 0-10 or 8-17, respectively. With standard light microscopy the epithelium of the lower tongue surface were quantitative examined for cell density (cells per mm epithel

length), thickness of the individual epithelial layers as well as the number of mitoses per mm epithelium. After immunohistochemical staining with TEC-3, the number of cells positive for the proliferation marker Ki-67 was defined.

Single dose irradiation alone results in an ED₅₀ (Dose, at which mucosal ulceration is expected in 50% of the animals) of 11,9±1,4 Gy, with a significant dose dependence (p=0,0001). Mean latent time was 9,2±0,7 days, ulcer duration 2,8±0,7 days. For fractionated irradiation over 1 or 2 weeks, the ED₅₀ for the terminating test irradiation was 6,7±2,1 Gy and 6,5±1,9 Gy, respectively. Mean latent times were 9,0±1,1 days and 6,0±0,8 days, mean ulcer duration 2,8±0,7 days and 2,7±1,0 days, respectively.

Administration of *BIBX1382BF* for 1 or 2 weeks did not yield a significant difference in ED₅₀ (8,3±1,6 Gy/7,6±1,6 Gy), ulcer duration (2,5±0,8 days/2,5±0,7 days) and latent time for fractionation over 1 week (8,4±1,2 days) compared to irradiation alone. In contrast, latent times after fractionation over 2 weeks was significantly reduced (5,3±0,5 days). The additional administration of *KGF* resulted in a significant increase in ED₅₀ for test irradiation over 1 or 2 weeks (11,3±1,3 Gy/12,3±0,9 Gy) compared to the other experiments. Latent times after 5x3 Gy (7,8±1,1 days) and ulcer durations of 2,5±0,8 days (5x3 Gy)/3,1±0,9 days (10x3 Gy) were not significantly different. However, for 2 weeks of fractionation, a significantly prolonged latent time of 8,7±1,0 days was observed compared to irradiation alone or irradiation plus *BIBX1382BF*.

Maximum cell loss after fractionated irradiation over 1 week (of ca. 70%) as well as over 2 weeks (of ca. 60%) was observed 1 day earlier with *BIBX1382BF* administration compared to irradiation alone. Additional administration of *KGF* delayed the cell loss in week one by 1-2 days, but similarly resulted in minimum of 70% earlier. In the second week, a maximum cell loss of only 20% was observed 1-2 days later than for irradiation +/- EGFR inhibition, while restoration of cell counts is observed 3 days earlier.

Epithelial thickness during irradiation alone and additional administration of *BIBX1382BF* is nearly unchanged. The administration of *KGF* yields a significant increase in the second week of up to a factor 3. This is based on an increase in the thickness of the keratin layer, but also of the layer of nucleated cells. The latter, in face of control cell numbers, must be attributed to an increase in individual cell volume to up to 166%.

The number of Ki-67 positive cells decrease up to 9% with additional EGFR inhibition, compared to irradiation alone. Administration of *KGF* even resulted in complete suppression of Ki-67 positive cells.

In summary, EGFR inhibition by *BIBX1382BF* did not result in a significant change in mucosal tolerance during the first two weeks of fractionated irradiation; only the latent time to manifestation of ulcerative lesions after 2 weeks is significantly shortened. Similarly, no significant impact on the mucoprotective efficacy of *KGF* is found. Therefore, a combination of fractionated radiotherapy with EGFR tyrosine kinase inhibitors as well as concomitant administration of *KGF* for mucoprotection seems possible. However, it remains unclear, if differences between the effect of *BIBX1382BF* and other inhibitors of the EGFR tyrosine kinase or of different substance classes (tyrosine kinase inhibitors vs. inhibiting receptor antibodies) exist. Hence, further preclinical, functional and mechanistic investigations are required.

8 Literaturverzeichnis

Achterberg P, Bergmann E, Bertz J, Böhm K, Bronnecke R, Burger M, et al. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gesundheit in Deutschland. Robert Koch-Institut, Statistisches Bundesamt, Herausgeber. Berlin; 2006. S. 69-77.

Ang KK, Xu FX, Landuyt W, Van der Schueren E. The kinetics and capacity of repair of sublethal damage in mouse lip mucosa during fractionated irradiations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1985;11:1977-1983.

Ara G, Watkins BA, Zhong H, Hawthorne TR, Karkaria CE, Sonis ST, et al. Velafermin (rhFGF-20) reduces the severity and duration of hamster cheek pouch mucositis induced by fractionated radiation. *Int J Radiat Biol.* 2008;84:401-412.

Armstrong JA, McCaffrey R. The effects of mucositis on quality of life in patients with head and neck cancer. *Clin J Oncol Nurs.* 2006;10:53-56.

Baatar D, Kawanaka H, Szabo IL, Pai R, Jones MK, Kitano S, et al. Esophageal ulceration activates keratinocyte growth factor and its receptor in rats: implications for ulcer healing. *Gastroenterology.* 2002;122:458-468.

Bateman KE, Catton PA, Pennock PW, Kruth SA. 0-7-21 Radiation therapy for the treatment of canine oral melanoma. *J Vet Intern Med.* 1994a;8:267-272.

Bateman KE, Catton PA, Pennock PW, Kruth SA. 0-7-21 Radiation therapy for the palliation of advanced cancer in dogs. *J Vet Intern Med.* 1994b;8:394-399.

Baumann M, Krause M. Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanisms, preclinical and clinical results. *Radiother Oncol.* 2004;72:257-266.

Baumann M, Krause M, Dikomey E, Dittmann K, Dörr W, Kasten-Pisula U, et al. EGFR-targeted anti-cancer drugs in radiotherapy: preclinical evaluation of mechanisms. *Radiother Oncol.* 2007;83:238-248.

Baumann M, Krause M, Zips D, Eicheler W, Dörfler A, Ahrens J, et al. Selective inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by BIBX1382BS and the improvement of growth delay, but not local control, after fractionated irradiation in human FaDu squamous cell carcinoma in the nude mouse. *Int J Radiat Biol.* 2003;79:547-559.

Bentzen SM. Repopulation in radiation oncology: perspectives of clinical research. *Int J Radiat Biol.* 2003;79:581-585.

Bentzen SM, Ruifrok ACC, Thames HD. Repair capacity and kinetics for human mucosa and epithelial tumors in the head and neck: clinical data on the effect of changing the time interval between multiple fractions per day in radiotherapy. *Radiother Oncol.* 1996;38:89-101.

- Bjarnason** GA, Jordan RC, Sothorn RB. Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium. *Am J Pathol.* 1999;154:613-622.
- Blackwood** L, Dobson JM. Radiotherapy of oral malignant melanoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;209:98-102.
- Bonner** JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006;354:567-578.
- Boonstra** J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P. The epidermal growth factor. *Cell Biol Int.* 1995;19:413-430.
- Bregazzi** VS, LaRue SM, Powers BE, Fettman MJ, Ogilvie GK, Withrow SJ. Response of feline oral squamous cell carcinoma to palliative radiation therapy. *Vet Radiol Ultrasound.* 2001;42:77-79.
- Brewer** WG, Turrel JM. Radiotherapy and hyperthermia in the treatment of fibrosarkomas in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1982;181:146-150.
- Brizel** DM, Herman T, Goffinet D, Sailer S, Agarwala S, Schwartz G, et al. A phase I/II trial of escalating doses of recombinant human keratinocyte growth factor (rHuKGF) in head and neck cancer (HNC) patients receiving radiotherapy (RT) with concurrent chemotherapy (CCT). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51:40.
- Brooks** M, Matus R, Leifer C, Alfieri A, Patnaik A. Chemotherapy versus chemotherapy plus radiotherapy in the treatment of tonsillar squamous cell carcinoma in the dog. *J Vet Intern Med.* 1988;2:206-211.
- Büntzel** J, Glatzel M, Schuth J, Weinaug R, Küttner K, Fröhlich D. Cytoprotection with amifostine in the framework of radiochemotherapy in previously irradiated head and neck carcinoma. *Strahlenther Onkol.* 1999;175:37-40.
- Caponigro** F. Rationale and clinical validation of epidermal growth factor receptor as a target in the treatment of head and neck cancer. *Anticancer Drugs.* 2004;15:311-320.
- Chen** C-S, Lavker RM, Rodeck U, Risse B, Jensen PJ. Use of a serum-free epidermal culture model to show deleterious effects of Epidermal Growth Factor on morphogenesis and differentiation. *J Invest Dermatol.* 1995;104:107-112.
- Chung** CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol.* 2006;24:4170-4176.

Ciekot PA, Powers BE, Withrow SJ, Straw RC, Ogilvie GK, LaRue SM. Histologically low-grade, yet biologically high-grade, fibrosarcomas of the mandible and maxilla in dogs: 25 cases (1982-1991). J Am Vet Med Assoc. 1994;204:610-615.

Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. J Biol Chem. 1962;237:1555-1562.

Dancey J. Epidermal growth factor receptor inhibitors in clinical development. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004;58:1003-1007.

Dewhirst MW, Sim DA, Forsyth K, Grochowski KJ, Wilson S, Bicknell E. Local control and distant metastases in primary malignant melanomas treated with hyperthermia and/or radiotherapy. Int J Hyperthermia. 1985;1:219-234.

Dittmann K, Mayer C, Fehrenbach B, Schaller M, Raju U, Milas L, et al. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. J Biol Chem. 2005;280:31182-31189.

Dittmann K, Mayer C, Wanner G, Kehlbach R, Rodemann HP. The radioprotector O-phospho-tyrosine stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor- and DNA-dependent kinase phosphorylation. Radiother Oncol. 2007;84:328-334.

Dörr W. Untersuchungen zur Strahlenreaktion des unbehandelten und stimulierten Zungenepithels der Maus [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians-Univ. München; 1987.

Dörr W. Repopulation in mouse oral mucosa: treatment splits. Radiother Oncol. 1994;33:139-147.

Dörr W. Strahlenbiologische Parameter der radiogenen Mucositis enoralis [Habilschr. med. vet]. Dresden: Technische Univ. Dresden; 1997a.

Dörr W. Three A's of repopulation during fractionated irradiation of squamous epithelia: asymmetry loss, acceleration of stem-cell divisions and abortive divisions. Int J Radiat Biol. 1997b;72:635-643.

Dörr W. Radiation-induced changes in expression of EGF and EGF-R in mouse tongue epithelium. Molecular Radiat Biol Oncol. 2000;1:57(abstract).

Dörr W. Oral mucosa: Response modification by keratinocyte growth factor. In: Nieder C, Milas L, Ang KK, editors. Modification of radiation response. Cytokines, Growth Factors and other biological targets. Heidelberg: Springer Verlag; 2003a. p. 113-123.

Dörr W. Modulation of repopulation processes in oral mucosa: experimental results. Int J Radiat Biol. 2003b;79:531-537.

- Dörr W, Arui J, Beisker W, Schultz-Hector S.** Cell kinetic studies in mouse tongue mucosa by autoradiographic, immunohistochemical and flow cytometric techniques. *Cell Prolif.* 1994b;27:321-332.
- Dörr W, Bässler S, Reichel S, Spekl K.** Reduction of radiochemotherapy-induced early oral mucositis by recombinant human keratinocyte growth factor (Palifermin): experimental studies in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005b;62:881-887.
- Dörr W, Baumann M, Herrmann T.** Die Nomenklatur modifizierter Fraktionierungsprotokolle in der Strahlentherapie. *Strahlenther Onkol.* 1996a;172:353-355.
- Dörr W, Breitner A, Kummermehr J.** Capacity and kinetics of SLD repair in mouse tongue epithelium. *Radiother Oncol.* 1993;27:36-45.
- Dörr W, Dölling-Jochem I, Baumann M, Herrmann T.** Therapeutische Beeinflussung der radiogenen oralen Mukositis. *Strahlenther Onkol.* 1997;173:183-192.
- Dörr W, Emmendorfer H, Weber-Frisch M.** Proliferation equivalent of accelerated repopulation in mouse oral mucosa. *Int J Radiat Biol.* 1994b;66:36-45.
- Dörr W, Emmendorfer H, Weber-Frisch M.** Tissue kinetics in mouse tongue mucosa during daily fractionated radiotherapy. *Cell Prolif.* 1996;29:495-504.
- Dörr W, Fehrmann A, Kerres K, Pieck S.** Changes in the expression of epidermal growth factor receptor in oral mucosa (mouse) during daily fractionated irradiation. *Molec Radiat Biol/Oncol.* 2007a;7:69.
- Dörr W, Gabriel P, Siegemund A, Noack R, Pickert A, Piro A.** Modification of radiation effects in oral mucosa (mouse) by adult stem cells. *Molec Radiat Biol/Oncol.* 2005c;6:91.
- Dörr W, Grötz KA, Hartmann JT, Riesenbeck D.** Orale Mukositis: Experimentelle und klinische Ansätze zur Prävention und Behandlung. *Onkologe.* 2007;13:150-157.
- Dörr W, Grötz K, Herrmann T, Riesenbeck D.** Merkblatt zur Mundtrockenheit. Dresden: Eigenverlag; 2004a.
- Dörr W, Hamilton CS, Boyd T, Reed B, Denham JW.** Radiation-induced changes in cellularity and proliferation in human oral mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002e;52:911-917.
- Dörr W, Heider K, Spekl K.** Reduction of oral mucositis by palifermin (rHuKGF): dose-effect of rHuKGF. *Int J Radiat Biol.* 2005d;81:557-565.
- Dörr W, Hendry JH.** Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol.* 2001;61:223-231.

Dörr W, Herrmann T. Akute Strahlenveränderungen der Gewebe. In: Bamberg M, Molls M, Sack H, editors. Radioonkologie Band 1: Grundlagen. München, Wien, New York: Zuckerschwerdt Verlag; 2003. S. 244-250.

Dörr W, Herrmann T, Reitemeier B, Riesenbeck D, Grötz KA. Folgen der Strahlentherapie in der Mundhöhle: Grundlagen, Einflussfaktoren, Prophylaxe und Therapie. Zahnmed up2date 5. Thieme; 2008.

Dörr W, Herrmann T, Riesenbeck D. Prävention und Therapie von Nebenwirkungen in der Radioonkologie. Bremen: Uni-Med Verlag; 2005.

Dörr W, Jakubec A, Kummermehr J, Herrmann T, Dölling-Jochem I, Eckelt U. Effects of stimulated repopulation on oral mucositis during conventional radiotherapy. Radiother Oncol. 1995;37:100-107.

Dörr W, Kummermehr J. Accelerated repopulation of mouse tongue epithelium during fractionated irradiations or following single doses. Radiother Oncol. 1990;17:249-259.

Dörr W, Kummermehr J. Proliferation kinetics of mouse tongue epithelium under normal conditions and following single dose irradiation. Virchows Arch B. 1991;60:287-294.

Dörr W, Kummermehr J. Increased radiation tolerance of mouse tongue epithelium after local conditioning. Int J Radiat Biol. 1992;61:369-379.

Dörr W, Lacmann A. Effects of keratinocyte growth factor on the radiation response of in vitro reconstituted oral mucosa. Cell Prolif. 2001;34:167.

Dörr W, Noack R, Spekl K, Farrell CL. Modification of oral mucositis by keratinocyte growth factor: single radiation exposure. Int J Radiat Biol. 2001;77:341-347.

Dörr W, Obeyesekere MN. A mathematical model for cell density and proliferation in squamous epithelium after single dose irradiation. Int J Radiat Biol. 2001;77:497-505.

Dörr W, Reichel S, Spekl K. Effects of keratinocyte growth factor (palifermin) administration protocols on oral mucositis (mouse) induced by fractionated irradiation. Radiother Oncol. 2005a;75:99-105.

Dörr W, Spekl K, Farrell CL. Amelioration of acute oral mucositis by keratinocyte growth factor: fractionated irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002a;54:245-251.

Dörr W, Spekl K, Farrell CL. The effect of keratinocyte growth factor on healing of manifest radiation ulcers in mouse tongue epithelium. Cell Prolif. 2002c;35:86-92.

Dörr W, Spekl K, Martin M. Radiation-induced oral mucositis in mice: strain differences. Cell Prolif. 2002d;35:60-67.

- Dörr W, Weber-Frisch M.** Effect of changing weekly dose on accelerated repopulation during fractionated irradiation of mouse tongue mucosa. *Int J Radiat Biol.* 1995a;67:577-585.
- Dörr W, Weber-Frisch M.** Repopulation response of mouse oral mucosa during unconventional radiotherapy protocol. *Radiother Oncol.* 1995b;37:230-236.
- Dörr W, Weber-Frisch M.** Short-term immobilization of mice by methohexitone. *Lab Anim.* 1999;33:35.
- Dorsch RMH.** Radiotherapie bei Hund und Katze. Eine Literaturstudie [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians-Univ. München; 2002.
- Eberlein R.** Röntgentherapie bei Haustieren. Berichte II. Röntgenkongress Hamburg; 1906.
- Edwards AWF.** Likelihood. The Johnson Hopkins University Press: Baltimore; 1992.
- Egeblad M, Mortensen OH, van Kempen LC, Jaattela M.** BIBX1382BS, but not AG1478 or PD153035, inhibits the ErbB kinases at different concentrations in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281:25-31.
- Ehrenfeld M, Prein J.** Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichts-Bereich. In: Schwenzer N, Ehrenfeld M, editors. Zahn-Mund-Kieferheilkunde. Band 2. Spezielle Chirurgie. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag; 2002. S. 99-127.
- Eichelberg H, Seine R.** Lebenserwartung und Todesursache bei Hunden. I. Zur Situation bei Mischlingen und verschiedenen Rassehunden. *Berlin München Tierärztl Wochenschr.* 1996;109:191-203.
- Elting LS, Cooksley CD, Chambers MS, Garden AS.** Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and neck malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;68:1110-1120.
- Epstein JB, Klasser GD.** Emerging approaches for prophylaxis and management of oropharyngeal mucositis in cancer therapy. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2006;11:353-373.
- Evans SM, LaCreta F, Helfand S, VanWinkle T, Curran WJ, Brown DQ, et al.** Technique, pharmacokinetics, toxicity and efficacy of intratumoral etanidazole and radiotherapy for treatment of spontaneous feline oral squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991;20:703-708.
- Evans S, Shofer F.** Canine oral nontonsillar squamous cell carcinoma. *Vet Radiol.* 1988;29:133-137.
- Farrell CL, Rex KL, Chen JN, Bready JV, DiPalma CR, Kaufman SA, et al.** The effects of keratinocyte growth factor in preclinical models of mucositis. *Cell Prolif.* 2002;35:78-85.

- Farrelly** J, Denman DL, Hohenhaus AE, Patnaik AK, Bergman PJ. Hypofractionated radiation therapy of oral melanoma in five cats. *Vet Radiol Ultrasound*. 2004;45:91-93.
- Fidel** JL, Sellou RK, Houston RK, Wheeler BA. A nine-day accelerated radiation protocol for feline squamous cell carcinoma. *Vet Radiol Ultrasound*. 2007;48:482-485.
- Finch** PW, Rubin JS. Keratinocyte Growth Factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors. *J Nat Canc Inst*. 2006;98:812-824.
- Fleischer** G, Dörr W. Amelioration of early radiation effects in oral mucosa (mouse) by intravenous or subcutaneous administration of Amifostine. *Strahlenther Onkol*. 2006;182:567-575.
- Forrest** LJ, Chun R, Adams WM, Cooley AJ, Vail DM. Postoperative radiotherapy for canine soft tissue sarcoma. *J Vet Intern Med*. 2000;14:578-582.
- Fowler** JF, Lindstrom MJ. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;23:457-467.
- Freeman** KP, Hahn KA, Harris FD, King GK. Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987-1997). *J Vet Intern Med*. 2003;17:96-101.
- Fu** KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, et al. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48:7-16.
- Gehrisch** A, Dörr W. Modification of oral mucositis by local or systemic administration of selenium: experimental studies in mice. *Strahlenther Onkol*. 2007;183:36-42.
- Genot** MT, Klastersky J. Low-level laser for prevention and therapy of oral mucositis induced by chemotherapy or radiotherapy. *Curr Opin Oncol*. 2005;17:236-240.
- Gibbs** S, Silva Ponto AN, Murli S, Huber M, Hohl D, Ponc M. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth and differentiation. *Wound Repair Regen*. 2000;8:192-203.
- Gillette** EL. Principles of radiation therapy. In: Theilen GH, Madewell BR: *Veterinary Cancer Medicine*. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1987. p. 137-143.
- Goepp** R, Fitch FW. Pathological study of oral radiation death in mice. *Radiat Res*. 1962;16:641-645.

Gogolok J, Schuemer R, Ströhlein G. Datenverarbeitung und statistische Auswertung mit SAS. Band I: Einführung in das Programmsystem, Datenmanagement und Auswertung. Stuttgart-Jena-New York: Gustav Fischer Verlag; 1992.

Grandis JR, Melham MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. J Natl Cancer Inst. 1998;90:824-832.

Grier CK, Mayer MN. Radiation therapy of canine nontonsillar squamous cell carcinoma. Can Vet J. 2007;48:1189-1191.

Grötz KA. Wissenschaftliche Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK): Zahnärztliche Betreuung von Patienten mit tumortherapeutischer Kopf-Hals-Bestrahlung. Deutsch Zahnärztl Z. 2002/2003;57:509-511 und Strahlenth Onkol. 2002/2003;179:275-278.

Grötz KA, Genitsariotis S, Vehling D, Al-Nawas B. Long-term oral Candida colonization, mucositis and salivary function after head and neck radiotherapy. Support Care Cancer. 2003;11:717-721.

Harari PM, Huang SM. Combining EGFR inhibitors with radiation or chemotherapy: will pre-clinical studies predict clinical results? Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004;58:976-983.

Hartmann JT, Dörr W, Steingraber M, Grötz KA. Leitlinienempfehlungen des Arbeitskreises Supportive Maßnahmen in der Onkologie (ASO) der Deutschen Krebsgesellschaft. Schleimhauttoxizität. Focus Onkol. 2008;11:51-53.

Henke M, Alfonsi M, Foa P, Giralt J, Bardet E, Cerezo L, et al. Palifermin significantly reduces severe oral mucositis in subjects with resected locally advanced head and neck cancer undergoing post-operative concurrent radiochemotherapy. Radiother Oncol. 2008;88:152 (abstract. 460).

Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004;59:21-26.

Herrmann T, Baumann M. Die Verlängerung der Wartezeit oder der Gesamtbehandlungszeit durch ungeplante Bestrahlungspausen. Klinische Bedeutung der Kompensation. Strahlenth Onkol. 2005;181:65-76.

Herrmann T, Baumann M, Dörr W. Klinische Strahlenbiologie – kurz und bündig. 4. Auflage. München: Elsevier; 2006.

Herrmann T, Dörr W, Grötz K, Riesenbeck D. Merkblatt zur Mundpflege. Dresden: Eigenverlag; 2002.

Herrmann T, Jacobek A, Trott KR. The importance of timing of a gap in radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Strahlenther Onkol.* 1994;170:545-549.

Hille A, Rave-Frank M, Pradier O, Damm C, Dörr W, Jackel MC, et al. Effect of keratinocyte growth factor on the proliferation, clonogenic capacity and colony size of human epithelial tumour cells in vitro. *Int J Radiat Biol.* 2003;79:119-128.

Hirschfeld D, Simon D, Schönrock D, Culmsee K, Mellin A, Nolte I. Strahlentherapie in der Kleintiermedizin. *Praktischer Tierarzt.* 2001;82:16-21.

Horiot JC, Bontemps P, van den Bogaert W, Le Fur R, van den Weijngaert D, Bolla M, et al. Accelerated fractionation (AF) compared to conventional fractionation (CF) improves loco-regional control in the radiotherapy of advanced head and neck cancers: results of the EORTC 22851 randomized trial. *Radiother Oncol.* 1997;44:111-21.

Howaldt HP, Kainz M. 8. Projektbericht des Zentralregisters des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK) für den Zeitraum vom 1. April 1989 – 20. Juni 1997. November 1997.

Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2000;6:2166-2174.

Hutson CA, Willauer CC, Walder EJ, Stone JL, Klein MK. Treatment of mandibular squamous cell carcinoma in cats by use of mandibulectomy and radiotherapy: seven cases (1987-1989). *J Am Vet Med Assoc.* 1992;201:777-781.

Igarashi M, Finch PW, Aaronson SA. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem.* 1998;273:13230-13235.

Kandel B. Strahlentherapie in der Kleintierpraxis. *Prakt Tierarzt.* 2004;85:476-481.

Kase M. Immunohistochemical studies on the expression of EGF and EGFR in irradiated mouse oral mucosa treated with KGF. MSc Radiobiology Course [Project Report]. London: University College of London; 2001.

Kaser-Hotz B. Prinzipien der Strahlentherapie. In: Kessler M, Herausgeber. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katzen. Berlin: Parey Buchverlag; 2005. S. 151-162.

Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, et al. Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer.* 2007;109:820-831.

Keller Uad, Krampert M, Kümin A, Braun S, Werner S. Keratinocyte growth factor: effects on keratinocytes and mechanisms of action. *Eur J Cell Biol.* 2004;83:607-612.

Kellett M, Hume WJ, Potten CS. A topographical study of the circadian rhythm in labelling index of mouse gingival and floor-of-mouth epithelium, including changes in labelling activity with individual cell position on the epithelial ridges. *Archs Oral Biol.* 1989;34:321-328.

Kerres K, Heider K, Dörr W. Modulation der radiogenen Mucositis enoralis durch Keratinozyten-Wachstumsfaktor: Histologische und zellkinetische Befunde. *Exp Strahlenther Klin Strahlenbiol.* 2003;12:103-107.

Kessler M. Tumoren des Gastrointestinaltraktes. In: Kessler M, Herausgeber. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katzen. Berlin: Parey Buchverlag; 2005. S. 252-298.

Kessler M. Chemotherapie. In: Kessler M, Herausgeber. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katzen. Berlin: Parey Buchverlag; 2005a. S. 113-150.

Kiliç Y, Rajewski K, Dörr W. Effect of post-exposure administration of keratinocyte growth factor (Palifermin) on radiation effects in oral mucosa in mice. *Radiat Environ Biophys.* 2007;46:13-19.

King GK, Harris DK, Stephens S, McMahon R, Haug G, Dailey R, et al. Successful local control of oral malignant melanoma in dogs using chemoradiation – 69 dogs (1986–1999). *Proc Annual Conference ACVR; Chicago: 1999.*

Klammt S. Einfluss einer Nachbehandlung mit Keratinozyten-Wachstumsfaktor (rHuKGF, Palifermin) auf die Mucositis enoralis (Maus) nach Einzelbestrahlung: Histologische und immunhistochemische Untersuchungen [Dissertation med. dent]. Dresden: Technische Univ. Dresden; 2005.

Kleiter M. Chemo- und Bestrahlungstherapie – wann und wie werden sie eingesetzt. Wissenschaftlicher Bericht der 21. VÖK-Jahrestagung; 16./17. September 2006; Salzburg, Österreich. 2006. S. 101-114.

Kraft W, Dürr UM. Katzenkrankheiten Klinik und Therapie. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Alfeld: Verlag M. & H. Schaper; 1996. S. 498-502 und 972-978.

Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterisation of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:9193-9197.

Krause M, Prager J, Zhou X, Yaromina A, Dörfler A, Eicheler W, et al. EGFR-TK inhibition before radiotherapy reduces tumour volume but does not improve local control: differential response of cancer stem cells and nontumorigenic cells. *Radiother Oncol*. 2007;83:316-325.

Krause M, Zips D, Thames HD, Kummermehr J, Baumann M. Preclinical evaluation of molecular-targeted anticancer agents for radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2006;80:112-122.

Kuschel M, Siegemund A, Gabriel P, Pickert A, Noack R, Dörr W. Modifikation der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut (Maus) durch Therapie mit adulten Stammzellen: fraktionierte Bestrahlung. *Exp Strahlenther Klin Strahlenbiol*. 2006;15:96-100.

LaDue-Miller T, Price GS, Page RL, Thrall DE. Radiotherapy of canine non-tonsillar squamous cell carcinoma. *Vet Radiol Ultrasound*. 1996;37:74-77.

Maciejewski B, Withers HR, Taylor JM, Hliniak A. Dose fractionation and regeneration in radiotherapy for cancer of the oral cavity and oropharynx. Part 2. Normal tissue response: acute and late effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1990;18:101-111.

Maciejewski B, Zajusz A, Pilecki B, Swiatnicka K, Dörr W, Kummermehr J, et al. Acute mucositis in the stimulated oral mucosa of patients during radiotherapy for head and neck cancer. *Radiother Oncol*. 1991;22:7-11.

MacMillan R, Withrow SJ, Gilette EL. Surgery and regional irradiation for treatment of canine tonsillar squamous cell carcinoma: retrospective review of eight cases. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1982;18:311-314.

Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58:903-913.

Marti GP, Mohebi P, Liu L, Wang J, Miyashita T, Harmon JW. KGF-1 for wound healing in animal models. *Methods Mol Biol*. 2008;423:383-391.

Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*. 2000;19:6550-6565.

Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of Cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:2787-2799.

Meropol NJ, Somer RA, Gutheil J, Pelley R, Modiano MR, Rowinsky E, et al. Randomized phase 1 trial of recombinant human keratinocyte growth factor (KGF) plus chemotherapy: potential role as a mucosal protectant. *J Clin Oncol*. 2003;21:1452-1458.

Milas L, Fan Z, Andratschke NH, Ang KK. Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58:966-971.

Milas L, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang KK, et al. In vivo enhancement of tumour radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody. Clin Cancer Res. 2000;6:701-708.

Moses R, Kummermehr J. Radiation response of the mouse tongue epithelium. Br J Cancer. 1986;53:12-15.

Mott JH, Livsey JE, Logue JP. Development of a simultaneous boost IMRT class solution for a hypofractionated prostate cancer protocol. British J Radiology. 2004;77:377-386.

Nanney LB, Magid M, Stoscheck CM, King Jr LE. Comparison of epidermal growth factor binding and receptor distribution in normal human epidermis and epidermal appendages. J Invest Dermatol. 1984;83:385-393.

Napenas JJ, Shetty KV, Streckfus CF. Oral mucositis: review of pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. Gen Dent. 2007;55:335-344.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Eingeweide. In: Habermehl KH, Vollmerhaus B, Wilkens H, Herausgeber. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band II. 7. unveränderte Auflage. Berlin, Wien, u.a.: Blackwell Wiss.-Verl.;1995. S. 58-75.

Nickstadt T. Kapazität und Kinetik der Erholung von subletalen Strahlenschäden in der Mundschleimhaut (Maus) bei Bestrahlung mit 200 kV Röntgenstrahlen [Dissertation med. dent]. Dresden: Technische Univ. Dresden; 2000.

Nicolatou-Galitis O, Velegraki A, Sotiropoulou-Lontou A, Dardoufas K, Kouloulis V, Kyprianou K, et al. Effect of fluconazole antifungal prophylaxis on oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy. Support Care Cancer. 2006;14:44-51.

Niemand HG, Suter PF. Praktikum der Hundeklinik. 9. neubearbeitete und erweiterte Auflage. Berlin: Parey Buchverlag; 2001. S. 1157-1226.

Ning S, Shui C, Khan WB, Benson W, Lacey DL, Knox SJ. Effects of Keratinocyte Growth Factor on the proliferation and radiation survival of human squamous cell carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1998;40:177-187.

Nuijen B, Bouma M, Henrar RE, Brauns U, Bette P, Bult A, et al. *In vitro* biocompatibility studies with the experimental anticancer agent BIBX1382BS. Int J Pharm. 2000;194:261-267.

Ogilvie GK, Moore AS, Obradovich JE, Elmslie RE, Vail DM, Straw RC, et al. Toxicoses and efficacy associated with administration of mitoxantrone to cats with malignant tumors. J Am Vet Med Assoc. 1993;202:1839-1844.

Overgaard J, Hansen HS, Specht L, Overgaard M, Grau C, Andersen E, et al. Five compared with six fractions per week of conventional radiotherapy of squamous cell carcinoma of head and neck: DAHANCA 6 and 7 randomised controlled trial. Lancet. 2003;365:933-940.

- Pabst S**, Spekl K, Dörr W. Changes in the effect of dose fraction during daily fractionated irradiation: studies in mouse oral mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58:485-492.
- Parkins CS**, Fowler JS, Yu S. A murine model of lip epidermal/mucosal reactions to X-irradiation. *Radiother Oncol.* 1983;1:159-165.
- Plowman GD**, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, et al. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA, Biochem.* 1993;90:1746-1750.
- Poirier VJ**, Bley CR, Roos M, Kaser-Hotz B. Efficacy of radiation therapy for the treatment of macroscopic canine oral soft tissue sarcoma. *In Vivo.* 2006;20:415-419.
- Postorino Reeves NC**, Turrel JM, Withrow SJ. Oral squamous cell carcinoma in the cat. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1993;29:438-441.
- Potten CS**, Booth D, Cragg NJ, O'Shea JA, Tudor GL, Booth C. Cell kinetic studies in the murine ventral tongue epithelium: the effects of repeated exposure to keratinocyte growth factor. *Cell Prolif.* 2002;35:22-31.
- Potten CS**, Hendry JH. Cytotoxic insults to tissues: Effects on cell lineages. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1983.
- Prigent SA**, Lemoine NR. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res.* 1992;4:1-24.
- Proulx DR**, Ruslander DM, Dodge RK, Hauck ML, Williams LE, Horn B, et al. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Vet Radiol Ultrasound.* 2003;44:352-359.
- Quastler H**, Austin MK, Miller M. Oral radiation death. *Radiat Res.* 1956;5:338-353.
- Rezvani M**, Ross GA. Modification of radiation-induced acute oral mucositis in the rat. *Int J Radiat Biol.* 2003;80:177-182.
- Riesenbeck D**, Dörr W. Documentation of radiation-induced oral mucositis. *Strahlenther Onkol.* 1998;174:44-46.
- Rubenstein EB**, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Am Canc Society Suppl.* 2004;100:2026-2046.
- Rubin JS**, Bottaro DP, Chedid M, Miki T, Ron D, Cunha GR, et al. Keratinocyte growth factor as a cytokine that mediates mesenchymal-epithelial interaction. *EXS.* 1995;74:191-214.

Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson A. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:802-806.

Rudat V, Meyer J, Momm F, Bendel M, Henke M, Strnad V, et al. Protective effect of amifostine on the dental health after radiotherapy of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48:1339-1343.

SAS Institute Inc., Cary, N.2.-8., U.S.A., SAS/STAT Users Guide Version 6.4. Auflage; 1990.

Schmidt-Ullrich RK, Morris MM. Fortschritte der Strahlentherapie von Hals-Nasen-Ohren-Karzinomen. In: Medical College of Virginia Hospitals, Herausgeber. *Klinische Onkologie*. 2000/'01. Virginia Commonwealth University, Department of Radiation Oncology, 2001: 34-39.

Schuemer R, Ströhlein G, Gogolok J. Datenverarbeitung und statistische Auswertung mit SAS. Band II: Komplexe statistische Analyseverfahren. Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag; 1990.

Sciubba JJ, Goldenberg D. Oral complications of radiotherapy. *Lancet Oncol*. 2006;7:175-183.

Seegenschmiedt MH. Nebenwirkungen in der Onkologie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag; 1998.

Seegenschmiedt MH, Zimmermann JS. Dokumentation von Nebenwirkungen. In: Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Herausgeber. *Nebenwirkungen in der Radioonkologie*. München: Urban und Vogel; 2000. S. 45-72.

Sepp-Lorenzino L, Eberhard I, Ma Z, Cho C, Serve H, Liu F, et al. Signal transduction pathways induced by heregulin in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Oncogene*. 1996;12:1679-1687.

Simon D, Ruslander DM, Rassnick KM, Wood CA, Frimberger AE, Cotter SM, et al. Orthovoltage radiation and weekly low dose of doxorubicin for the treatment of incompletely excised soft-tissue sarcomas in 39 dogs. *Vet Rec*. 2007;160:321-326.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-182.

Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury. Pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer Suppl*. 2004;100:1995-2024.

Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Path.* 1990;69:437-443.

Spielberger RT, Stiff P, Bensinger W, Gentile T, Weisdorf D, Kewalramani T, et al. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic Cancers. *N Engl J Med.* 2004;351:2590-2598.

Srinivasan R, Poulsom R, Hurst HC, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumour types. *J Pathol.* 1998;185:236-245.

Stebbins KE, Morse CC, Goldschmidt MH. Feline oral neoplasia. *Vet Pathol.* 1989;26:121-128.

Steel GG. Basic Clinical Radiobiology. 3rd. ed. London: Arnold Publishers; 2002. p. 58-63.

Stokman MA, Spijkervet FK, Boezen HM, Schouten JP, Roodenburg JL, de Vries EG. Preventive intervention possibilities in radiotherapy- and chemotherapy-induced oral mucositis: results of meta-analyses. *J Dent Res.* 2006;85:690-700.

Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, et al. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:2164-2170.

Thames HD, Hendry JH. Fractionation in Radiotherapy. London: Taylor and Francis; 1987.

Theon A, Griffey S, Metzger L. Radiation therapy of carcinomas of the oral cavity in cats: Influence of tumor proliferation. *Vet Radiol Ultrasound.* 1996;37:469.

Theon AP, Rodriguez C, Griffey S. Analysis of prognostic factors and patterns of failure in dogs with periodontal tumors treated with megavoltage irradiation. *J Am Vet Med Assoc.* 1997b;210:785-788.

Theon AP, Rodriguez C, Madewell BR. Analysis of prognostic factors and patterns of failure in dogs with malignant oral tumors treated with megavoltage irradiation. *J Am Vet Med Assoc.* 1997a;210:778-784.

Thrall DE. Orthovoltage radiotherapy of oral fibrosarcomas in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1981;179:159-162.

Thrall DE. Orthovoltage radiotherapy of acanthomatous epulides in 39 dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1984;184:826-829.

Todoroff RJ, Brodey RS. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: A retrospective survey of 361 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1979;175:567-571.

Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, Wang S, Chen J, Dittmann K, et al. Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. Clin Cancer Res. 2006;12:4119-4126.

Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systemic literature review. Radiother Oncol. 2003;66:253-62.

UICC, Wittekind CH, Meyer HJ, Bootz F. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag; 2002.

Verdi CJ. Cancer therapy and oral mucositis. An appraisal of drug prophylaxis. Drug Safety. 1993;9:185-195.

Von Bültzingslöwen I, Brennan MT, Spijkervet FK, Logan R, Stringer A, Raber-Durlacher JE, et al. Growth factors and cytokines in the prevention and treatment of oral and gastrointestinal mucositis. Supp Care Cancer. 2006;14:519-527.

Warnakulasuriya KA, MacDonald DG. Diurnal variation in labelling index in human buccale epithelium. Arch Oral Biol. 1993;38:1107-1111.

Werner S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes, Cytokine & Growth Factor Reviews. Elsevier Science Ltd. 1998;9:153-165.

White RAS. Mandibulectomy and maxillectomy in the dog: long term survival in 100 cases. J Small Anim Pract. 1991;32:69-74.

WHO-Handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva: World Health Organisation; 1979. p. 48.

Wikstrand CJ, Bigner DD. Prognostic applications of the epidermal growth factor receptor and its ligand, transforming growth factor- α . J Natl Cancer Inst. 1998;90:799-801.

Withers HR. Cell renewal system concepts and the radiation response. Front Radiat Ther Oncol. 1972;6:93-107.

Withers HR. The four R's of radiotherapy. In: Lett JT, Adler H, editors. Advances in radiation biology. 5th. ed. New York: Academ Press; 1975. p. 241-271.

Zimmermann F, Siefert A, Wypior HJ, Rexrodt P. Allgemeine Grundsätze der Strahlentherapie. In: Wollenberg B, Zimmermann F, Herausgeber. Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Manual Kopf-Hals-Malignome. München: Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München; 2003. S. 48-56.

Amgen Inc. Kepivance™ (palifermin). 2005 (zitiert vom 17.06.2008): 1-12, <http://www.amgenoncology.com/pdfs/misc/kepivance_PI.pdf>.

Feyer P, Bruns F, Fraunholz I, Heide J, Riesenbeck D, Steingraber M, et al. Leitlinien in der Radioonkologie. Supportive Maßnahmen. AG Nebenwirkungen/Supportivtherapie. AWMF-Registriernummer 052/014. 2006 (zitiert vom 05.06.2008):1-7, <<http://www.degro.org/dav/html/download/pdf/LeitlinieSupportiveMaßnahmen.pdf>>.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V und das RKI. Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends. 6.überarbeitete, aktualisierte Auflage. Berlin. 2008 (zitiert vom 15.06.2008): 17-26, <<http://www.rki.de/krebs>>.

Hartmann JT, Dörr W, Steingraber M, Grötz KA. Schleimhauttoxizität. Leitlinie des Arbeitskreises Supportive Maßnahmen in der Onkologie. 2007 (zitiert vom 04.06.2008):1-4, <http://www.onkosupport.de/aso/content/e974/e1743/e1940/e2093/e1958/071123_ASOLeitlinie_Schleimhaut.pdf>.

Kaser-Hotz B. Strahlentherapie. 2001 (zitiert vom 17.06.08): 1-29, <<http://www.studvet.de/downloads/strahlentherapiekaserothz.pdf>>.

NCI (National Cancer Institut): Common Toxicity Criteria for Adverse Events v3.0. 2006 (zitiert vom 30.06.2009):19-28, <http://ctep.cancer.gov/protocol/Development/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf>.

Wilkowski R, Zimmermann F. Supportive Maßnahmen in der Strahlentherapie. In: Heineemann V, Tumorzentrum München, Herausgeber. MANUAL Supportive Maßnahmen und symptomorientierte Therapie. München, Bern, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag; 2001 (zitiert vom 06.06.08): 140-149, <<http://www.med.uni-muenchen.de/TZMuenchen/>>.

9 Anhang

9.1 SPF-Bedingungen im Experimentellen Zentrum: getestete Mikroorganismen

9.1.1 Viren:

Mäusehepatitisvirus (MHV), Rotavirus der Maus (EDIM), Minute Virus of Mice (MVM), Mouse Parvo Virus (MPV), Sendaivirus, Theilersches Encephalomyelitisvirus der Maus (TMEV), Ektromelie, Virus der lymphozytären Choriomeningitis (LCM), Adenovirus der Maus (MAd), Zytomegalievirus der Maus (MCMV), Pneumonievirus der Maus (PVM), Reovirus Typ 3 (Reo3)

9.1.2 Bakterien und Pilze:

Bordetella bronchiseptica, Citrobacter rhodentium, Clostridium piliformae, Corynebacterium kutscheri, E. coli, Helicobacter spp., Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Mycoplasma spp., Pasteurellaceae, Proteus spp., Pseudomonas aeruginosa, Salmonella sp., Staphylococcus aureus, Streptobacillus moniliformis, Streptococcus sp. β -hämolisierend, Streptococcus pneumoniae

9.1.3 Parasiten:

Aspicularis sp., Syphacia sp., Coccidien, Giardia sp., Spironucleus muris, sonstige Flagellaten, Arthropoden, Trichomonaden

9.2 Reagenzien zur HE-Färbung für Paraffinschnitte

- 0,5 % Eosinlösung (100 ml 1 % alkalische Eosinlösung auf 100 ml Ethanol 96 %)
- Xylol zum Entparaffinieren der Schnitte
- Absteigende Alkoholreihe zum Hydratisieren (Ethanol absolutus, Ethanol absolutus, Ethanol 96 %, Ethanol 96 %, Ethanol 70 %, Ethanol 40 %)
- Mayers Hämalun (1g Hämatoxylin in 1 l Aqua dest., 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure)
- Entellan (Entellan®neu, Merck KGaA, Darmstadt)

9.3 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung mit TEC-3

- Primärantikörper: Monoklonal Rat, Anti-Mouse Ki-67 Antigen, Clone TEC-3:
Fa. Dako, Glostrup Dänemark
Konzentration: 1:50 (1 μ l auf 50 μ l PBS)
- VECTASTAIN*Elite*ABC KIT (Rat IgG) (Vector Laboratories, USA)
 1. Normalserum (15 μ l auf 1 ml PBS)
 2. Sekundärantikörper (5 μ l auf 1 ml PBS)
 3. ABC-Komplex (20 μ l Reagenz A, 20 μ l Reagenz B, 1 ml PBS)
- Xylol
- Aufsteigende und absteigende Alkoholreihe mit jeweils 2x 100 %, 2x 96 %, 70 % und 40%igem Alkohol
- PBS-Puffer (5 l Aqua dest., 36 g NaCl, 7,4 g Na₂HPO₄, 2,15 g KH₂PO₄)
- Citratpuffer (18 ml 0,1 M Zitronensäure, 82 ml 0,1 M Na-Citratlösung, 1000 ml Aqua dest.)
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂-Lösung 30 % stabilisiert)
- DAB (0,6 g 3,3'-Diaminobenzidin 99 %, Aldrich® auf 100 ml PBS)

9.4 Reagenzien für die immunhistochemische Färbung mit Cytokeratin 6 Antikörper

- Primärantikörper: Monoklonal Mouse, Cytokeratin 6 - Antikörper, Clone LHK6B
kreuzreagierend mit Mensch und Maus
Fa. Abcam Limited, Cambridgeshire, UK
Konzentration: 1:25 (1µl auf 25 µl PBS/Biotinylation Reagent/Blocking Reagent)
- The DAKO ARK™, (Animal Research Kit), Peroxidase K3954 + K3955
 - Peroxidase Block (Bottle 1)
 - Biotinylate Primary Antibody (positive oder negative Kontrolle): Vorbereitung
 1. Schritt: Lösungsmittel (PBS), konzentrierten primären Antikörper (positiv oder negativ) und Biotinylation Reagent mischen, 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
 2. Schritt: Blocking Reagent hinzufügen, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
 - Streptavidin-Peroxidase (Bottle 4)
 - DAB + Substrate-Chromogen (Bottle 5+6)
- Xylol
- Aufsteigende und absteigende Alkoholreihe mit jeweils 2x 100 %, 2x 96 %, 70 % und 40%igem Alkohol
- PBS-Puffer (5 l Aqua dest., 36 g NaCl, 7,4 g Na₂HPO₄, 2,15 g KH₂PO₄)
- Citratpuffer (18 ml 0,1 M Zitronensäure, 82 ml 0,1 M Na-Citratlösung, 1000 ml Aqua dest.)

9.5 Tabellen

9.5.1 Zellzahlen

Tab. 17: Veränderungen der Zellzahl des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht	
	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]
0	578 ± 5	100 ± 1	431 ± 6	100 ± 1	147 ± 5	100 ± 3
1	583 ± 57	101 ± 10	392 ± 39	91 ± 9	191 ± 19	130 ± 13
2	490 ± 43	85 ± 7	333 ± 32	77 ± 7	157 ± 12	107 ± 8
3	483 ± 24	84 ± 4	340 ± 25	79 ± 6	143 ± 10	97 ± 7
4	465 ± 59	80 ± 10	335 ± 45	78 ± 10	130 ± 14	88 ± 10
5	439 ± 10	76 ± 2	320 ± 8	74 ± 2	119 ± 6	81 ± 4
6	428 ± 9	74 ± 2	311 ± 6	72 ± 1	117 ± 4	80 ± 3
7	475 ± 16	82 ± 3	358 ± 10	83 ± 2	117 ± 10	80 ± 7
8	543 ± 34	94 ± 6	398 ± 25	92 ± 6	145 ± 9	99 ± 6
9	488 ± 8	84 ± 1	351 ± 6	81 ± 1	137 ± 5	93 ± 3
10	572 ± 14	99 ± 2	425 ± 16	99 ± 4	147 ± 5	100 ± 3

Tab. 18: Veränderungen der Zellzahl des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy/2 Wochen. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase. Die Werte für die erste Bestrahlungswoche (Tage 1-7) finden sich in Tabelle 19.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht	
	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]
0	578 ± 5	100 ± 1	431 ± 6	100 ± 1	147 ± 5	100 ± 3
Die Werte für die Tage 1-7 finden sich in Tabelle 17.						
8	412 ± 16	71 ± 3	308 ± 14	71 ± 3	105 ± 3	71 ± 2
9	360 ± 3	62 ± 1	270 ± 2	63 ± 1	90 ± 4	61 ± 3
10	426 ± 46	74 ± 8	319 ± 41	74 ± 10	107 ± 6	73 ± 4
11	441 ± 33	76 ± 6	334 ± 30	77 ± 7	107 ± 4	73 ± 3
12	410 ± 12	71 ± 2	311 ± 10	72 ± 2	99 ± 5	67 ± 3
13	414 ± 17	72 ± 3	312 ± 17	72 ± 4	102 ± 2	69 ± 1
14	449 ± 16	78 ± 3	348 ± 15	81 ± 3	102 ± 3	69 ± 2
15	514 ± 21	89 ± 4	392 ± 22	91 ± 5	121 ± 1	82 ± 1
16	608 ± 13	105 ± 2	463 ± 14	107 ± 3	145 ± 5	99 ± 3
17	643 ± 17	111 ± 3	492 ± 17	114 ± 4	151 ± 1	103 ± 1

Tab. 19: Veränderungen der Zellzahl des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche und oraler Gabe von BIBX1382BF. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht	
	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]
0	578 ± 5	100 ± 1	431 ± 6	100 ± 1	147 ± 5	100 ± 3
1	580 ± 2	100 ± 1	407 ± 5	94 ± 1	173 ± 5	118 ± 3
2	545 ± 29	94 ± 5	381 ± 19	88 ± 4	165 ± 11	112 ± 7
3	420 ± 26	73 ± 4	283 ± 14	66 ± 3	136 ± 12	93 ± 8
4	432 ± 45	75 ± 8	301 ± 33	70 ± 8	131 ± 12	89 ± 8
5	405 ± 26	70 ± 4	305 ± 27	71 ± 6	100 ± 4	68 ± 3
6	438 ± 25	76 ± 4	330 ± 28	77 ± 6	109 ± 3	74 ± 2
7	416 ± 42	72 ± 7	321 ± 35	74 ± 8	95 ± 7	65 ± 5
8	498 ± 16	86 ± 3	385 ± 7	89 ± 2	113 ± 9	77 ± 6
9	525 ± 30	91 ± 5	400 ± 26	93 ± 6	125 ± 4	85 ± 3
10	581 ± 8	101 ± 1	424 ± 11	98 ± 3	157 ± 8	107 ± 5

Tab. 20: Veränderungen der Zellzahl des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche, oraler Gabe von BIBX1382BF und subkutaner Injektion von KGF. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht	
	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]
0	-	-	-	-	-	-
1	621 ± 11	107 ± 2	404 ± 12	94 ± 3	216 ± 1	147 ± 1
2	614 ± 54	106 ± 9	397 ± 41	92 ± 10	217 ± 13	148 ± 9
3	439 ± 12	76 ± 2	298 ± 6	69 ± 1	140 ± 7	95 ± 5
4	395 ± 36	68 ± 6	282 ± 20	65 ± 5	113 ± 16	77 ± 11
5	553 ± 19	96 ± 3	406 ± 12	94 ± 3	146 ± 9	99 ± 6
6	678 ± 27	117 ± 5	449 ± 19	104 ± 4	229 ± 14	156 ± 10
7	678 ± 17	117 ± 3	452 ± 1	105 ± 1	227 ± 16	154 ± 11
8	667 ± 28	115 ± 5	468 ± 29	109 ± 7	199 ± 4	135 ± 3
9	625 ± 13	108 ± 2	448 ± 10	104 ± 2	177 ± 5	120 ± 3
10	729 ± 39	126 ± 7	518 ± 24	120 ± 6	211 ± 16	144 ± 11

Tab. 21: Veränderungen der Zellzahl des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy/2 Wochen und oraler Gabe von BIBX1382BF. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase. Die Werte für die erste Bestrahlungswoche (Tage 1-7) finden sich in Tabelle 21.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht	
	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]
0	578 ± 5	100 ± 1	431 ± 6	100 ± 1	147 ± 5	100 ± 3
Die Werte für die Tage 1-7 finden sich in Tabelle 19.						
8	362 ± 7	63 ± 1	280 ± 1	65 ± 1	83 ± 6	56 ± 4
9	463 ± 42	80 ± 7	357 ± 30	83 ± 7	106 ± 13	72 ± 9
10	365 ± 16	63 ± 3	280 ± 8	65 ± 2	85 ± 8	58 ± 5
11	388 ± 19	67 ± 3	298 ± 18	69 ± 4	89 ± 3	61 ± 2
12	374 ± 20	65 ± 3	289 ± 10	67 ± 2	85 ± 10	58 ± 7
13	381 ± 15	66 ± 3	285 ± 19	66 ± 4	98 ± 4	67 ± 3
14	375 ± 9	65 ± 2	286 ± 4	66 ± 1	88 ± 5	60 ± 3
15	444 ± 27	77 ± 5	337 ± 16	78 ± 4	107 ± 11	73 ± 7
16	589 ± 7	102 ± 1	449 ± 8	104 ± 2	140 ± 4	95 ± 3
17	653 ± 20	113 ± 3	478 ± 22	111 ± 5	175 ± 14	119 ± 10

Tab. 22: Veränderungen der Zellzahl des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy/2 Wochen, oraler Gabe von BIBX1382BF und subkutaner Injektion von KGF. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase. Die Werte für die erste Bestrahlungswoche (Tage 1-7) finden sich in Tabelle 22.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht	
	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]	Zellzahl/mm ± SEM	[%]
0	-	-	-	-	-	-
Die Werte für die Tage 1-7 finden sich in Tabelle 20.						
8	671 ± 34	116 ± 6	443 ± 17	103 ± 4	227 ± 17	154 ± 12
9	501 ± 42	87 ± 7	335 ± 25	78 ± 6	166 ± 17	113 ± 12
10	507 ± 17	88 ± 3	362 ± 16	84 ± 4	145 ± 4	99 ± 3
11	446 ± 2	77 ± 1	333 ± 4	77 ± 1	112 ± 2	76 ± 1
12	517 ± 22	89 ± 4	389 ± 16	90 ± 4	128 ± 7	87 ± 5
13	709 ± 63	123 ± 11	486 ± 42	113 ± 10	223 ± 23	152 ± 16
14	593 ± 24	103 ± 4	411 ± 22	95 ± 5	182 ± 2	124 ± 1
15	610 ± 42	106 ± 7	437 ± 32	101 ± 7	173 ± 11	118 ± 7
16	636 ± 31	110 ± 5	461 ± 13	107 ± 3	175 ± 21	119 ± 14
17	594 ± 51	103 ± 9	444 ± 40	103 ± 9	151 ± 13	103 ± 9

9.5.2 Epitheldicken

Tab. 23: Veränderungen der Dicke (D) des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht		Keratinschicht	
	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]
0	91 ± 12	100 ± 13	23 ± 2	100 ± 9	51 ± 16	100 ± 31	17 ± 5	100 ± 29
1	60 ± 6	66 ± 7	19 ± 1	83 ± 4	24 ± 6	47 ± 12	16 ± 1	94 ± 6
2	78 ± 1	86 ± 1	24 ± 1	104 ± 4	33 ± 1	65 ± 2	21 ± 1	124 ± 6
3	60 ± 6	66 ± 7	21 ± 2	91 ± 9	21 ± 3	41 ± 6	19 ± 2	112 ± 12
4	78 ± 8	86 ± 9	24 ± 4	104 ± 17	29 ± 4	57 ± 8	25 ± 7	147 ± 41
5	99 ± 10	109 ± 11	24 ± 1	104 ± 4	48 ± 6	94 ± 12	27 ± 3	159 ± 18
6	86 ± 5	95 ± 5	20 ± 3	87 ± 13	42 ± 4	82 ± 8	23 ± 2	135 ± 12
7	70 ± 5	77 ± 5	20 ± 1	87 ± 4	36 ± 3	71 ± 6	14 ± 3	82 ± 18
8	74 ± 6	81 ± 7	21 ± 2	91 ± 9	33 ± 3	65 ± 6	19 ± 2	112 ± 12
9	54 ± 3	59 ± 3	18 ± 2	78 ± 9	22 ± 2	43 ± 4	14 ± 1	82 ± 6
10	77 ± 6	85 ± 7	24 ± 1	104 ± 4	37 ± 5	73 ± 10	16 ± 2	94 ± 12

Tab. 24: Veränderungen der Dicke (D) des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy/2 Wochen. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase. Die Werte für die erste Bestrahlungswoche (Tage 1-7) finden sich in Tabelle 25.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht		Keratinschicht	
	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]
0	91 ± 12	100 ± 13	23 ± 2	100 ± 9	51 ± 16	100 ± 31	17 ± 5	100 ± 29
Die Werte für die Tage 1-7 finden sich in Tabelle 23.								
8	119 ± 15	131 ± 16	16 ± 2	70 ± 9	44 ± 6	86 ± 12	60 ± 8	353 ± 47
9	149 ± 24	164 ± 26	21 ± 1	91 ± 4	54 ± 11	106 ± 22	74 ± 12	435 ± 71
10	173 ± 17	190 ± 19	21 ± 1	91 ± 4	65 ± 7	127 ± 14	86 ± 9	506 ± 53
11	168 ± 16	185 ± 18	22 ± 2	96 ± 9	63 ± 6	124 ± 12	84 ± 8	494 ± 47
12	190 ± 6	209 ± 7	23 ± 1	100 ± 4	72 ± 4	141 ± 8	95 ± 3	559 ± 18
13	156 ± 9	171 ± 10	23 ± 2	100 ± 9	55 ± 3	108 ± 6	78 ± 5	459 ± 29
14	149 ± 11	164 ± 12	22 ± 1	96 ± 4	53 ± 4	104 ± 8	75 ± 6	441 ± 35
15	175 ± 15	192 ± 16	28 ± 2	122 ± 9	60 ± 6	118 ± 12	88 ± 7	518 ± 41
16	190 ± 11	209 ± 12	29 ± 3	126 ± 13	66 ± 2	129 ± 4	95 ± 5	559 ± 29
17	201 ± 19	221 ± 21	26 ± 1	113 ± 4	74 ± 10	145 ± 20	101 ± 10	594 ± 59

Tab. 25: Veränderungen der Dicke (D) des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter sowie nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy und der oralen Gabe von BIBX1382BF. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht		Keratinschicht	
	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]
0	91 ± 12	100 ± 13	23 ± 2	100 ± 9	51 ± 16	100 ± 31	17 ± 5	100 ± 29
1	68 ± 10	75 ± 11	21 ± 1	91 ± 4	31 ± 8	61 ± 16	16 ± 2	94 ± 12
2	75 ± 9	82 ± 10	18 ± 3	78 ± 13	39 ± 6	76 ± 12	18 ± 4	106 ± 24
3	77 ± 16	85 ± 18	20 ± 3	87 ± 13	42 ± 10	82 ± 20	15 ± 3	88 ± 18
4	73 ± 13	80 ± 14	19 ± 4	83 ± 17	35 ± 8	69 ± 16	19 ± 2	112 ± 12
5	65 ± 6	71 ± 7	23 ± 1	100 ± 4	28 ± 3	55 ± 6	15 ± 2	88 ± 12
6	83 ± 8	91 ± 9	22 ± 1	96 ± 4	36 ± 7	71 ± 14	25 ± 3	147 ± 18
7	66 ± 7	73 ± 8	20 ± 3	87 ± 13	29 ± 4	57 ± 8	17 ± 1	100 ± 6
8	76 ± 10	84 ± 11	22 ± 2	96 ± 9	37 ± 8	73 ± 16	17 ± 1	100 ± 6
9	92 ± 9	101 ± 10	26 ± 4	113 ± 17	45 ± 5	88 ± 10	21 ± 2	124 ± 12
10	96 ± 17	105 ± 19	22 ± 1	96 ± 4	45 ± 12	88 ± 24	28 ± 4	165 ± 24

Tab. 26: Veränderungen der Dicke (D) des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche, oraler Gabe von BIBX1382BF und subkutaner Injektion von KGF. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht		Keratinschicht	
	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]
0	91 ± 12	100 ± 13	23 ± 2	100 ± 9	51 ± 16	100 ± 31	17 ± 5	100 ± 29
1	90 ± 2	99 ± 2	23 ± 1	100 ± 4	45 ± 3	88 ± 6	23 ± 1	135 ± 6
2	119 ± 11	131 ± 12	25 ± 2	109 ± 9	64 ± 12	125 ± 24	30 ± 1	176 ± 6
3	83 ± 7	91 ± 8	21 ± 2	91 ± 9	37 ± 6	73 ± 12	26 ± 3	153 ± 18
4	84 ± 17	92 ± 19	20 ± 5	87 ± 22	41 ± 7	80 ± 14	23 ± 5	135 ± 29
5	135 ± 17	148 ± 19	39 ± 1	170 ± 4	66 ± 10	129 ± 20	30 ± 6	176 ± 35
6	199 ± 9	219 ± 10	42 ± 2	183 ± 9	113 ± 7	222 ± 14	43 ± 3	253 ± 18
7	160 ± 25	176 ± 27	30 ± 4	130 ± 17	86 ± 13	169 ± 25	43 ± 8	253 ± 47
8	134 ± 16	147 ± 18	26 ± 1	113 ± 4	66 ± 10	129 ± 20	43 ± 6	253 ± 35
9	112 ± 14	123 ± 15	29 ± 2	126 ± 9	46 ± 6	90 ± 12	37 ± 6	218 ± 35
10	114 ± 9	125 ± 10	29 ± 3	126 ± 13	59 ± 10	116 ± 20	26 ± 4	153 ± 24

Tab. 27: Veränderungen der Dicke (D) des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy/2 Wochen und oraler Gabe von BIBX1382BF. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase. Die Werte für die erste Bestrahlungswoche (Tage 1-7) finden sich in Tabelle 27.

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionsschicht		Keratinschicht	
	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]
0	91 ± 12	100 ± 13	23 ± 2	100 ± 9	51 ± 16	100 ± 31	17 ± 5	100 ± 29
Die Werte für die Tage 1-7 finden sich in Tabelle 25.								
8	134 ± 1	147 ± 1	17 ± 1	74 ± 4	50 ± 1	98 ± 2	67 ± 1	394 ± 6
9	134 ± 11	147 ± 12	21 ± 2	91 ± 9	46 ± 5	90 ± 10	67 ± 6	394 ± 35
10	124 ± 6	136 ± 7	18 ± 1	78 ± 4	44 ± 3	86 ± 6	62 ± 3	365 ± 18
11	143 ± 8	157 ± 9	20 ± 1	87 ± 4	51 ± 3	100 ± 6	71 ± 4	418 ± 24
12	114 ± 11	125 ± 12	18 ± 2	78 ± 9	39 ± 4	76 ± 8	57 ± 5	335 ± 29
13	99 ± 15	109 ± 16	15 ± 2	65 ± 9	35 ± 6	69 ± 12	49 ± 8	288 ± 47
14	114 ± 8	125 ± 9	21 ± 1	91 ± 4	36 ± 3	71 ± 6	57 ± 4	335 ± 24
15	124 ± 13	136 ± 14	21 ± 0	91 ± 0	41 ± 6	80 ± 12	62 ± 6	365 ± 35
16	178 ± 12	196 ± 13	29 ± 1	126 ± 4	60 ± 5	118 ± 10	89 ± 6	524 ± 35
17	174 ± 17	191 ± 19	26 ± 4	113 ± 17	61 ± 5	120 ± 10	87 ± 9	512 ± 53

Tab. 28: Veränderungen der Dicke des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy/2 Wochen, oraler Gabe von BIBX1382BF und subkutaner Injektion von KGF. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase. Die Werte für die erste Bestrahlungswoche (Tage 1-7) finden sich in Tabelle 28.

Tag	Gesamtepithel		Germinativ-schicht		Funktionsschicht		Keratinschicht	
	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]	D±SEM [µm]	D±SEM [%]
0	-	-	-	-	-	-	-	-
Die Werte für die Tage 1-7 finden sich in Tabelle 26.								
8	270 ± 26	297 ± 29	30 ± 6	130 ± 26	105 ± 8	206 ± 16	135 ± 13	794 ± 76
9	223 ± 19	245 ± 21	27 ± 5	117 ± 22	85 ± 5	167 ± 10	111 ± 9	653 ± 53
10	202 ± 9	222 ± 10	27 ± 3	117 ± 13	74 ± 4	145 ± 8	101 ± 4	594 ± 24
11	200 ± 13	220 ± 14	26 ± 2	113 ± 9	74 ± 6	145 ± 12	100 ± 7	588 ± 41
12	237 ± 40	260 ± 44	34 ± 6	148 ± 26	84 ± 14	165 ± 27	119 ± 20	700 ± 118
13	321 ± 44	353 ± 48	43 ± 5	187 ± 22	118 ± 21	231 ± 41	161 ± 22	947 ± 129
14	253 ± 23	278 ± 25	27 ± 2	117 ± 9	99 ± 10	194 ± 20	126 ± 12	741 ± 71
15	229 ± 19	252 ± 21	27 ± 1	117 ± 4	88 ± 9	173 ± 18	114 ± 10	671 ± 59
16	262 ± 38	288 ± 42	30 ± 2	130 ± 9	101 ± 17	198 ± 33	131 ± 19	771 ± 112
17	167 ± 12	185 ± 13	24 ± 3	104 ± 13	60 ± 3	118 ± 6	84 ± 6	494 ± 35

9.5.3 Relatives Zellvolumen

Tab. 29: Veränderungen des relativen Zellvolumen sowohl der Germinativ- als auch der Funktionsschicht unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 5x3 Gy/Woche, oraler Gabe von BIBX1382BF und/oder subkutaner Injektion von KGF. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase.

Tag	5x3 Gy		5x3 Gy, BIBX		5x3 Gy, BIBX + KGF	
	rel Zellvolumen [%]		rel. Zellvolumen [%]		rel. Zellvolumen [%]	
	Germinativ-schicht	Funktions-schicht	Germinativ-schicht	Funktions-schicht	Germinativ-schicht	Funktions-schicht
0	100	100	100	100	-	-
1	91	36	97	52	107	60
2	135	61	89	68	118	85
3	116	42	132	89	132	76
4	134	64	118	77	133	105
5	141	116	141	81	180	130
6	121	103	125	95	175	143
7	105	89	117	88	124	109
8	99	66	107	94	104	96
9	96	46	122	104	121	75
10	106	73	97	83	105	81

Tab 30: Veränderungen des relativen Zellvolumen sowohl der Germinativ- als auch der Funktionsschicht unter/nach fraktionierter Bestrahlung mit 10x3 Gy/2 Wochen, oraler Gabe von BIBX1382BF und/oder subkutaner Injektion von KGF. Die im Fettdruck markierten Tage entsprechen den Bestrahlungstagen, die unmarkierten Tage kennzeichnen die Heilungsphase.

Tag	10x3 Gy		10x3 Gy, BIBX		10x3 Gy, BIBX + KGF	
	rel Zellvolumen [%]		rel. Zellvolumen [%]		Rel. Zellvolumen [%]	
	Germinativ-schicht	Funktions-schicht	Germinativ-schicht	Funktions-schicht	Germinativ-schicht	Funktions-schicht
0	100	100	100	100	-	-
Die Werte für die Tage 1-7 finden sich in Tabelle 29.						
8	97	121	114	174	127	133
9	146	173	110	125	151	148
10	123	175	120	149	140	147
11	123	170	126	165	146	190
12	139	210	117	132	164	189
13	138	155	99	103	166	153
14	118	150	138	118	123	157
15	134	143	117	110	116	147
16	117	131	121	124	122	166
17	99	141	102	100	101	115

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Oechtering sowie Herrn Dr. E. Ludewig für die Betreuung und Vermittlung des Themas an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Dörr für die Überlassung des Themas sowie die jederzeit gewährte schnelle Hilfe und umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung der Arbeit.

Der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus des Universitätsklinikums Dresden danke ich für die Erlaubnis zur Nutzung der Einrichtungen. Gleichzeitig möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Labors für die fachliche Beratung und technische Unterstützung bedanken.

Den Mitarbeitern der AG Normalgewebe der „Experimentellen Strahlenbiologie“, insbesondere Frau Dr. K. Spekl und Frau Dr. M. Kuschel, gilt mein Dank für die kollegiale Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit. Für die freundliche Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Präparate seien Frau M. Oelsner und Frau L. Stolz-Kieslich herzlich gedankt. Für die Einführung in die immunhistochemischen Färbetechniken bedanke ich mich bei Frau S. Balschukat und Frau S. Klammt.

Bei der Firma Boehringer Ingelheim Austria, Wien bedanke ich mich für die Bereitstellung des Inhibitors BIBX1382BF und bei der Firma AMGEN Inc. (Thousand Oaks, CA, USA) für den Keratinozyten-Wachstumsfaktor „Palifermin“.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an meine Eltern, die mir das Tiermedizinstudium ermöglicht und mich in allem jederzeit unterstützt haben. Besonders danke ich meiner Mutter für die fortwährende Hilfe und meinem Freund für die Geduld.